

**Université de Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc**

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Montpellier II

Discipline : Virologie

Formation Doctorale : Parasitologie

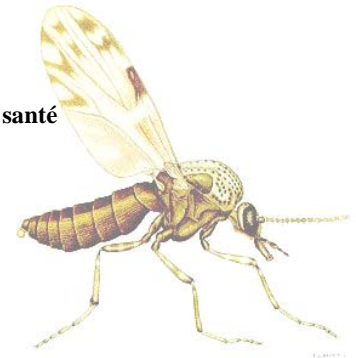
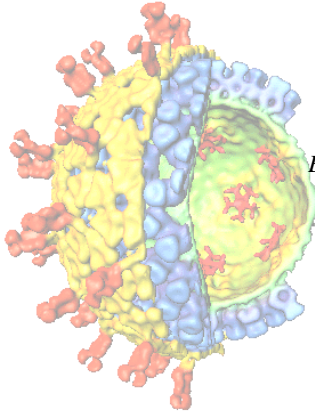
École Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement

par

Aurélie Anne Perrin

le 23 Novembre 2007



**Contribution au développement de vaccins capripoxviraux
recombinants contre la Fièvre Catarrhale Ovine**



JURY:

Pr. Max BERGOIN, Université Montpellier II, Montpellier
Dr. Pierre Charles LEFEVRE, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris
Dr. Stephan ZIENTARA, AFSSA, Maisons-Alfort
Dr. Catherine CETRE-SOSSAH, CIRAD, Montpellier
Dr. Stéphane BERTAGNOLI, ENVT, Toulouse
Dr. Emmanuel ALBINA, CIRAD, Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse

**Université de Montpellier II
Sciences et Techniques du Languedoc**

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Montpellier II

Discipline : Virologie

Formation Doctorale : Parasitologie

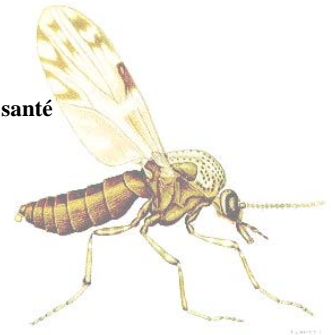
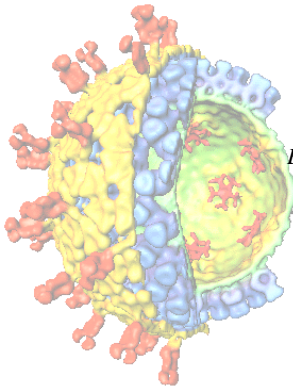
École Doctorale : Sciences chimiques et biologiques pour la santé

Présentée et soutenue publiquement

par

Aurélie Anne Perrin

le 23 Novembre 2007



**Contribution au développement de vaccins capripoxviraux
recombinants contre la Fièvre Catarrhale Ovine**



JURY:

Pr. Max BERGOIN, Université Montpellier II, Montpellier

Dr. Pierre Charles LEFEVRE, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris

Dr. Stephan ZIENTARA, AFSSA, Maisons-Alfort

Dr. Catherine CETRE-SOSSAH, CIRAD, Montpellier

Dr. Stéphane BERTAGNOLI, ENVT, Toulouse

Dr. Emmanuel ALBINA, CIRAD, Montpellier

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Ce travail a été réalisé au
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique
pour le Développement
- CIRAD -

Dans l'unité propre de recherche
« Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes » et
plus particulièrement au sein de l'équipe virologie

Sous la direction d'Emmanuel ALBINA

Ce travail a été financé par la Région Languedoc Roussillon et le
CIRAD



Remerciements

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux membres du jury, Mme CETRE-SOSSAH, MM BERGOIN, LEFEVRE, ZIENTARA, BERTAGNOLI, et ALBINA, qui ont accepté de juger ce travail.

Je tenais à remercier Dominique MARTINEZ, responsable de l'UPR15 et Emmanuel ALBINA, chef du service virologie, de m'avoir accueillie dans leur équipe pour mon stage de DEA et de m'avoir renouvelé leur confiance pour ce travail de thèse qui a été si enrichissant.

Au cours de ces 3 années, j'ai rencontré deux femmes qui ont été mes guides dans le monde de la recherche et de l'enseignement :

Catherine, je voudrais t'exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accompagnée tout au long de ces 4 années passées au CIRAD. Je tenais à te remercier pour ce que tu avais fait pour moi, pour m'avoir aidé dans les démarches administratives et scientifiques, pour m'avoir écoutée et soutenue quand il le fallait. Je suis fière d'avoir été ta première étudiante en DEA puis en thèse...sans toi ce travail n'aurait jamais été possible. Merci du fond du cœur.

Hélène, je te remercie pour m'avoir aidé à gérer au mieux mes enseignements à l'Université de Nîmes avec mes travaux de recherche. Tu as énormément fait pour moi et j'en suis très touchée.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

- *Valérie et Philippe* pour m'avoir formée au cytomètre en flux,
- *Laurence*, pour les bases théoriques en immunologie,
- *Daniel Gargani* pour la microscopie électronique en transmission,
- *Pierre Russo, Jean marie Guibert et Richard Thiery* pour nous avoir accueillis si chaleureusement à Sophia Antipolis,

- *Noël et Thierry* pour tous ces bons moments passés à l'animalerie. Noël, ta patience et ta gentillesse font de toi le meilleur animalier que les biquettes pouvaient rêver d'avoir !!!

Beaucoup de gens m'ont entourée pendant cette dure mais si enrichissante expérience et leur soutien m'a été plus que précieux...

Un grand merci à:

Colette, pour ta bonne humeur et ta gentillesse. J'ai apprécié partager ton bureau même si je ne regretterai absolument pas ton téléphone et ton fauteuil grinçant...

Cécile, pour tous tes bons conseils et ta patience...Tu as toujours su me donner une réponse aux innombrables questions que je te posais et je t'en suis très reconnaissante.

Christian pour toutes ces matinées et ces samedi où nous errions dans le laboratoire...Je me suis sentie moins seule.

David Bienvenu, pour ce 30 août 2007 où tu as sauvé ma thèse des caprices d'un ordinateur colérique....Grâce à toi j'ai compris l'importance des sauvegardes informatiques.

Et à tous ceux qui ont été là...*Olivier, Patricia, Geneviève, Renata, Djénéba*

Merci à tous mes ami(e)s...

Sylvie, tu as été ma bouffée d'air frais pendant ces 2 dernières années, par ta gentillesse, ta bonne humeur et tous ces bons moments passés ensemble. Surtout ne change rien, tu es quelqu'un de formidable. Vincent, merci à toi aussi...☺

Carinne, on s'est rencontré peut être un peu tard mais le peu de semaines passées à tes côtés a été un réel bonheur. Tu m'as énormément aidé pour ma présentation et sans toi celle-ci n'aurait pas été aussi bien. Un énorme merci après corrections...☺

Isa & Margo, depuis toutes ses années que nous nous connaissons (8 ans maintenant) vous me supportez dans les meilleurs comme dans les pires moments...merci pour tous ces bons souvenirs et j'espère que nous en aurons beaucoup d'autres. Maciej, merci à toi aussi...☺

Julie, tu as également toujours été là quand il le fallait, tu as su me réconforter sur ce monde si difficile qu'est celui de la recherche. Tu as été mon deuxième cerveau en gérant mon agenda dans mes moments de flottement. Florian, merci à toi aussi...☺

Je voudrais remercier toute ma famille et plus particulièrement mes parents, sans qui bien évidemment tout ça n'aurait jamais été possible. Merci beaucoup pour tout ce que vous avez fait et j'espère pouvoir vous le rendre un jour. J'ai rarement eu l'occasion de vous dire que vous comptiez énormément pour moi et que j'avais beaucoup de chance de vous avoir comme parents. « Merci *papa*, merci *maman* ».

Merci à toi *Fabien*, de m'avoir écoutée et soutenue, d'avoir su rester à mes côtés. Je te remercie pour tout ce que tu m'apportes, et pour tout ce que tu représentes à mes yeux. Je t'aime tout simplement.

A mon grand père Noël,
A mes parents.

Table des matières

Remerciements.....	3
Liste des abréviations	11
Liste des figures	14
Liste des tableaux.....	17
Introduction	19
Partie I : Etat des connaissances.....	23
<u>Chapitre 1 - La Fièvre Catarrhale Ovine.....</u>	<u>24</u>
1 - Historique	24
2 - Epidémiologie et impact économique	25
3 - Etiologie	27
3-1 - Morphologie et structure	29
3-2 - Immunogénicité des protéines.....	31
3-3 - Cycle de réplication	32
4 - La maladie	33
4-1 - Pathogénie	33
4-2 - Symptômes.....	34
4-2-1 - Pathologie observée chez les ovins	34
4-2-2 - Pathologie observée chez les bovins et les caprins	37
4-2-3 - Pathologie observée dans la faune sauvage.....	38
4-3 - Diagnostic	38
4-3-1 - Diagnostic clinique	38
4-3-2 - Diagnostic de laboratoire	39

5 - Le vecteur	40
5-1 - Taxonomie et morphologie.....	40
5-2 - Biologie et distribution.....	42
5-3 - Implication des Culicoides dans la transmission de la FCO.....	44
6 - Contrôle de la maladie.....	46
6-1 - Réseaux d'épidémio-surveillance.....	46
6-1-1 - Surveillance Entomologique	46
6-1-2 - Surveillance Virologique	47
6-2 - Lutte anti-vectorielle	48
6-2-1 - Lutte anti-larves	48
6-2-2 - Lutte anti-adultes.....	49
6-3 - Lutte contre l'agent pathogène	49
6-3-1 - Les vaccins à virus atténué.....	49
6-3-2 - Les vaccins à virus inactivé.....	50
6-3-3 - Les vaccins dits de « nouvelle génération »	51
<u>Chapitre 2 - Les poxvirus</u>	53
1 - Historique	53
2 - Classification	54
3 - Epidémiologie et répartition géographique	55
3-1 - Les Orthopoxvirus.....	55
3-2 - Les Capripoxvirus.....	56
4 - Etiologie	57
4-1 - Structure.....	57
4-2 - Cycle viral.....	58
5 - La maladie	60
5-1 - Symptômes.....	60
5-2 - Diagnostic	61

5-3 - Prophylaxie	61
6 - Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux	62
6-1 - Propriétés.....	62
6-2 - Les poxvirus en tant que vecteurs d'expression.....	64
6-3 - Les capripoxvirus en tant que vecteurs d'expression.....	64
Cadre et Objectifs	66
 Partie II : Développement de vaccins poxviraux recombinants exprimant différents gènes du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine et Evaluation de l'immunogénicité induite chez les petits ruminants.....	69
 <u>Chapitre 3 - Elaboration et validation des constructions plasmidiques <i>in vitro</i></u>	<u>70</u>
1- Matériel et méthodes	71
1-1 - Virus et cellules.....	71
1-2 - Construction des plasmides de transfert	72
1-3 - Elaboration des capripoxvirus recombinants FCO	74
1-3-1 - Validation de l'expression <i>in vitro</i> des capripoxvirus recombinants FCO.....	74
1-3-2 - Transfection, purification et production des capripoxvirus recombinants FCO.....	75
1-3-3 - Vérification par PCR de la présence des gènes insérés	76
1-3-4 - Vérification de l'expression protéique des gènes FCO, par immunofluorescence.	78
1-4 - Production et titrage des capripoxvirus recombinants FCO.....	79
2 - Résultats	79
2-1 - Vérification des constructions plasmidiques.....	79
2-2 - Validation de l'expression des capripoxvirus recombinants FCO	81
2-2-1 - Expression <i>in vitro</i>	81

2-2-2 - Purification.....	83
2-2-2-1 - Analyse par immunofluorescence	84
2-2-2-2 - Evaluation de la pureté par PCR	85
3- Conclusion.....	88

Chapitre 4 - Démonstration de l'effet protecteur des capripoxvirus recombinants FCO.....89

1- Immunisation de chèvres avec la souche vaccinale KS-1	89
1-1 - <i>Matériel et méthodes</i>	89
1-1-1 - Modèle d'étude	89
1-1-2 - Evaluation de la réponse immunitaire	90
1-1-2-1 - Recherche d'anticorps par la technique d'immunofluorescence	90
1-1-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire.....	90
1-2 - <i>Résultats</i>	92
1-2-1 - Evaluation de la réponse humorale	92
1-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire.....	93
2 - Immunisation de chèvres et de moutons avec les différentes constructions de poxvirus recombinants FCO	96
2-1 - <i>Matériel et méthodes</i>	96
2-1-1 - Modèle d'étude	96
2-1-1-1 - Expérimentation sur chèvres	97
2-1-1-2 - Expérimentation sur moutons.....	97
2-1-2 - Méthodes.....	98
2-1-2-1 - Recherche d'anticorps	98
2-1-2-2 - Analyse de la réponse cellulaire	100
2-1-2-3 - Evaluation de la protection.....	101
2-2 - <i>Résultats</i>	103
2-2-1 - Evaluation de la réponse humorale	103
2-2-1-1 - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence	103
2-2-1-2 - Détection des anticorps anti-HPPR par ELISA de compétition	104

2-2-1-3 - Détection des anticorps anti-NS1/NS3/VP7 par ELISA indirect.....	104
2-2-1-3 - Détection des anticorps anti-VP2 par neutralisation virale.....	106
2-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire chez les chèvres.....	107
2-2-2-1 - Lymphoprolifération	107
2-2-2-2 - Lymphoblastogenèse.....	109
2-2-3 - Evaluation de la protection.....	110
2-2-3-1 - Virémie	110
2-2-3-2 - Pathologie et scores cliniques	111
2-3 - Conclusion	113

Chapitre 5 - Amélioration du système vaccinal et validation *in vitro* 115

1 - Matériel et Méthodes	115
1-1 - Construction du nouveau plasmide de transfert	115
1-2 - Validation fonctionnelle de la construction par expression transitoire.....	117
1-3 - Observations en microscopie électronique en transmission.....	118
2 - Résultats	119
2-1 - Vérification de la construction plasmidique	119
2-2 - Validation de l'expression <i>in vitro</i> du capripoxvirus double recombinant.....	121
2-3 - Microscopie électronique en transmission.....	123
3 - Conclusion.....	125

Discussion et perspectives 126

Conclusion générale 139

Références Bibliographiques..... 141

Annexes 180

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AHSV	African Horse Sickness Virus
Amp ^r	Résistance au gène de l'Ampicilline
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Atb	Antibiotiques
BET	Bromure d'Ethidium
BHK21	Baby Hamster Kidney 21
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	BlueTongue
BTv	BlueTongue Virus
CFSE	CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester
ConA	Concanavaline A
Cpox	Capripoxvirus
Cpox-FCO	Capripoxvirus recombinant pour la Fièvre Catarrhale Ovine
Cpox-NS1	Capripoxvirus recombinant NS1
Cpox-NS3	Capripoxvirus recombinant NS3
Cpox-VP2	Capripoxvirus recombinant VP2
Cpox-VP7	Capripoxvirus recombinant VP7
db	Double brin
DEPC	DiEthylPyroCarbonate
DICT	Dose Infectieuse en culture tissulaire
DIVA	Differentiation between infected and vaccinated animals
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO	Densité Optique
<i>Ecogpt</i>	<i>Escherichia coli</i> guanine phosphoribosyltransferase
ECP	Effet CytoPathique
EDTA	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
ETM52	Embryon Total de Moutons 52
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agricultural Organization
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
FCO	Fièvre Catarrhale Ovine
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
HPPR	Hémagglutinine du virus de la Peste des Petits Ruminants
ID	IntraDermique
IFN	InterFéroN
IL	InterLeukine
IM	IntraMusculaire
KV	KiloVolt
kpb	Kilo paire de bases

KS-1	Kenya sheep -1
LB	Luria Bertani
L-glu	L-glutamine
LSDV	Lumpy Skin Disease Virus
LTC	Lymphocytes T Cytotoxiques
M	Molaire
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MET	Microscope Electronique en Transmission
MOI	Multiplicity Of Infection
ml	Millilitre
mM	MilliMolaire
MM	Marqueur de poids Moléculaire
MPA	MycoPhenolic Acid
nm	Nanomètre
NS1	Non Structural protein 1
NS2	Non Structural protein 2
NS3	Non Structural protein 3
OA3Ts	<i>Ovis aries</i> 3 Testis
OBP	Onderstepoort Biologicals Products
OIE	Office International des Epizooties
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
OptiMEM	Optimised Eagle's Minimum Essential Medium
pb	paire de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	PhycoErythrin
PFA	ParaFormAldéhyde
pIL1	Promoteur i L 1
pKSCATpSGPT	Plasmide Bluescript, CAripoxvirus, gène de la Thymidine kinase, promoteur Synthétique, gène <i>EcoGPT</i>
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PPR	Peste des Petits Ruminants
PPRV	Peste des Petits Ruminants Virus
pS	Promoteur Synthétique
RK13	Rabbit Kidney 13
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SBF	Sérum Bovin Fœtal
SC	Sous Cutané
SSC	Side Scatter
rpm	Rotation per minute
TBE	Tris-Borate-Ethylnediaminetetraacetic
TC	Tri-Color
TK	Thymidine Kinase
TK _{5'}	Région 5' du gène de la thymidine Kinase
TK _{3'}	Région 3' du gène de la thymidine Kinase
VERO	Cellules de reins de singes vert, <i>Cercopithecus aethiops</i>
VP1	Viral Protein 1

VP2	Viral Protein 2
VP3	Viral Protein 3
VP4	Viral Protein 4
VP5	Viral Protein 5
VP6	Viral Protein 6
VP7	Viral Protein 4
VV	Vaccinia Virus

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1 - Carte de répartition de la fièvre catarrhale ovine	26
Figure 2 - Représentation schématique de la structure du virus de la FCO	31
Figure 3 - Symptômes observés chez des moutons atteints d'une forme aiguë de la FCO	36
Figure 4 - Symptômes observés chez des bovins atteints de FCO	37
Figure 5 - Patrons alaires de <i>Culicoides obsoletus</i> , <i>Culicoides scoticus</i> et <i>Culicoides imicola</i>	41
Figure 6 - Photographie de <i>Culicoides imicola</i>	41
Figure 7 - Représentation schématique du cycle biologique des <i>Culicoides spp</i>	43

Chapitre 2

Figure 8 - Répartition géographique de la clavelée du mouton et de la variole caprine	56
Figure 9 - Répartition géographique de la dermatose nodulaire contagieuse	57
Figure 10 - Représentation schématique de la structure d'un <i>Poxvirus</i>	58
Figure 11 - Représentation schématique du cycle de réplication des <i>Orthopoxvirus</i>	59
Figure 12 - Symptômes observés chez un bovin atteint de dermatose nodulaire contagieuse.	60
Figure 13 - Lésions papulo-vésiculeuses chez une chèvre atteinte de variole caprine	61

Chapitre 3

Figure 14 - Représentation schématique du plasmide de transfert pKSCATpSGPT	73
Figure 15 - Carte de restriction du plasmide de transfert, pKSCATpSGPT-VP7	73
Figure 16 - Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants	77
Figure 17 - Amplification par PCR du gène VP7 de la FCO, sérotype 2	79
Figure 18 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du pKSCATpSGPT-VP7	80
Figure 19 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP7	81

Figure 20 - Amplification par PCR du gène de la β -actine au cours de l'expression <i>in vitro</i> des plasmides de transfert	82
Figure 21 - Amplification par PCR des gènes d'intérêt FCO au cours de l'expression <i>in vitro</i> des plasmides de transfert	82
Figure 22 - Amplification par PCR du gène NS1 de la FCO au cours de l'expression <i>in vitro</i> du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-NS1	83
Figure 23 - Effet cytopathique observé sur des cellules OA3Ts infectées par le recombinant CpoX-NS1, en milieu sélectif liquide.....	83
Figure 24 - Effet cytopathique observé sur des cellules OA3Ts infectées avec le recombinant CpoX-NS1, en milieu sélectif avec agarose	84
Figure 25 - Détection des anticorps anti-VP7 par immunofluorescence lors des dilutions sérielles du virus recombinant CpoX-VP7	85
Figure 26 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-NS1.....	86
Figure 27 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-NS3.....	86
Figure 28 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-VP2.....	87
Figure 29 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-VP7.....	87

Chapitre 4

Figure 30 - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence chez les chèvres immunisées avec la souche KS-1	92
Figure 31 - Evolution de la réponse IFN γ après restimulation avec l'antigène total KS-1	93
Figure 32 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la réponse IFN γ	94
Figure 33 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la lymphoblastogenèse	94
Figure 34 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la blastogenèse des différentes sous populations lymphocytaires.....	94
Figure 35 - Calendrier expérimental des essais capripoxvirus recombinants	96
Figure 36 - Détection d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence dans des sérums caprins au cours des essais <i>in vivo</i> des capripoxvirus recombinants	103
Figure 37 - Réponse anti-HPPR chez les chèvres immunisées avec les recombinants CpoX-FCO	104
Figure 38 - Réponse anti-NS3 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants	105
Figure 39 - Réponse anti-VP7 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants	106

Figure 40 - Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les antigènes FCO et KS-1	108
Figure 41 - Activation des lymphocytes après restimulation avec les antigènes FCO et KS-1	109
Figure 42 - Symptômes observés chez les moutons au cours des essais capripoxvirus recombinants....	112
Figure 43 - Scores cliniques obtenus chez les moutons après épreuve virulente homologue	112
Figure 44 - Courbes de température observées chez les moutons au cours de l'expérimentation Cpox-FCO	113

Chapitre 5

Figure 45 - Représentation schématique du principe d'amplification du gène VP7 par PCR avec le promoteur pIL1 et les sites de restriction SpeI/NotI, en queue flottante.....	116
Figure 46 - Carte de restriction du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7.....	116
Figure 47 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du PKSCATpSGPT-VP3.....	119
Figure 48 - Double digestion enzymatique ClaI/SmaI de différentes minipréparations du pKSCATpSGPT-VP3	120
Figure 49 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du PKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7	120
Figure 50 - Digestions enzymatiques par SpeI/NotI des plasmides pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7 ..	121
Figure 51 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 par des cellules OA3Ts transfectées avec le capripoxvirus double recombinant.....	121
Figure 52 - Expression de l'ARNm lors de l'expression <i>in vitro</i> du double recombinant	122
Figure 53 - Observation au MET de virions de capripoxvirus, souche KS-1	123
Figure 54 - Observation au MET de l'expression de la protéine VP7 du virus FCO, après transfection de cellules OA3Ts avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7	124
Figure 55 - Observation en MET de possibles pseudo particules virales du virus de la FCO	124

Discussion et perspectives

Figure 56 - Répartition géographique de la FCO et des infections à capripoxvirus (varioles ovine et caprine, Dermatose nodulaire contagieuse)	128
Figure 57 - Transfection de cellules OA3Ts avec le plasmide pKSCATpSGFP-VP2.....	132
Figure 58 - Expression de la protéine VP7 par immunofluorescence sous contrôle du promoteur synthétique ou du promoteur IL-1	136

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1 - Classification des différents sérogroupes appartenant au genre <i>Orbivirus</i>	28
Tableau 2 - Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO	30
Tableau 3 - Liste des 33 espèces du genre <i>Culicoides</i> impliquées dans la transmission de la FCO	45

Chapitre 2

Tableau 4 - Classification de la sous-famille des <i>Chordopovirinae</i>	54
---	----

Chapitre 3

Tableau 5 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors des expressions <i>in vitro</i>	75
Tableau 6 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors du processus de sélection.....	78

Chapitre 4

Tableau 7 - Liste des anticorps I ^{aires} et II ^{aires} utilisés pour le typage des populations lymphocytaires	92
Tableau 8 - Liste des scores associés à chaque signe clinique induit par la FCO	102
Tableau 9 - Titres viraux obtenus par séroneutralisation chez les moutons immunisés par les capripoxvirus recombinant FCO.....	107
Tableau 10 - Suivi de la virémie dans le sang des chèvres lors des essais capripoxvirus recombinants	110
Tableau 11 - Suivi de la virémie dans le sang des moutons lors des essais capripoxvirus recombinants	111

Chapitre 5

Tableau 12 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors de l'expression <i>in vitro</i> du capripoxvirus double recombinant FCO	118
--	-----

Discussion et perspectives

Tableau 13 - Concentrations des différents milieux sélectifs testés lors des processus de sélection des virus recombinant	131
--	-----

INTRODUCTION

La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) ou BlueTongue (BT) est une maladie animale d'origine virale, vectorielle et non contagieuse, pouvant engendrer de fortes pertes économiques dans les cheptels touchés, principalement ovins. Selon la définition de l'Office International des Epizooties (OIE), la FCO fait partie des « maladies ayant un grand pouvoir de diffusion et une gravité particulière, susceptibles de s'étendre au-delà des frontières nationales, dont les conséquences socio-économiques ou sanitaires sont graves et dont l'incidence sur les échanges internationaux d'animaux et de produits d'origine animale est très important ». L'agent pathogène, responsable de la maladie (genre *Orbivirus*, famille *Reoviridae*), est transmis par piqûres d'insectes diptères hématophages appartenant au genre *Culicoides*. A l'heure actuelle, 24 sérotypes distincts ont été décrits, avec une aire de répartition, une pathologie et un insecte vecteur, qui leur sont propres. L'incidence clinique de la FCO est variable en fonction de l'espèce animale infectée (ovins, bovins, caprins, cervidés, camélidés...) et du sérotype incriminé. Les conséquences sanitaires restent jusqu'alors plus importantes dans la filière ovine. Les pertes peuvent être soit directes avec un taux de mortalité variable (de 2 à 20 %) et de nombreux avortements, soit indirectes suite à la dégradation de la qualité de la laine et au déclassement des carcasses. Les conséquences économiques sont essentiellement liées au blocage des échanges d'animaux au niveau international. La FCO se traduit chez les ovins par une symptomatologie associant hyperthermie, dépression, anorexie avec la présence de lésions oedémateuses congestives, hyperhémiques voire hémorragiques.

Autrefois cantonnée entre les 30^{èmes} /40^{èmes} parallèles Sud et les 40^{èmes}/50^{èmes} parallèles Nord, cette maladie s'est récemment étendue dans le bassin méditerranéen, au Sud de l'Europe puis vers le Nord de l'Europe. La raison de cette extension peut être double : d'abord l'abondance et l'expansion des insectes vecteurs vers le Nord et la possible compétence de nouveaux vecteurs. Les modifications écologiques engendrées par l'homme peuvent également largement influencer la dynamique de l'infection. Par exemple, l'effet de serre a une action importante sur le réchauffement climatique et par conséquent sur l'écologie des vecteurs et des arboviroses qui leurs sont associées. Le lien entre le réchauffement climatique et l'augmentation de l'aire de distribution des vecteurs de la FCO est ainsi fortement suspecté.

Un des moyens de lutte les plus efficaces contre cette maladie est la vaccination ; cependant la multiplicité de sérotypes rencontrés complique cette action de

prévention. Les plans de campagne vaccinale actuels reposent sur l'utilisation des deux seuls types de vaccins disponibles sur le marché : les vaccins à virus atténué et les vaccins à virus inactivé, tout deux spécifiques de chaque sérotype. Les animaux immunisés contre un sérotype viral développent une réponse immunitaire qui les protège contre ce sérotype mais restent sensibles à l'infection par un autre sérotype viral. De nombreux travaux ont été menés ces dernières années sur le développement de vaccins dits de « nouvelle génération », cependant jusqu'ici aucun d'entre eux n'a abouti à un vaccin protégeant les animaux contre plusieurs sérotypes. Il existe donc, en terme sanitaire, un enjeu important, pour le développement de vaccins multivalents à dose unique, conférant une immunité protectrice de longue durée et permettant également de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés (vaccins DIVA pour «Differentiation between Infected and Vaccinated Animals»).

Ainsi, les objectifs de mon travail de thèse ont été définis de la manière suivante :

- dans un premier temps, il s'agissait de développer un vaccin dit de « nouvelle génération » élaboré à partir d'un virus appartenant à la famille des *Poxviridae* et au genre *Capripoxvirus*, le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou LSDV (Lumpy Skin Disease Virus), qui serait alors utilisé comme vecteur d'expression d'un ou plusieurs gènes conservés du virus de la FCO.
- dans un second temps, l'évaluation de ces différentes constructions vaccinales a été envisagée tant en terme de réponses immunitaires qu'en terme de protection chez les petits ruminants.

Le présent manuscrit est organisé en deux parties et cinq chapitres. La première partie correspond à l'état des connaissances actuelles sur le modèle étudié au travers d'un premier chapitre consacré à la fièvre catarrhale ovine et d'un second aux *Poxvirus* et de leur utilisation en tant que vecteurs vaccinaux.

Les résultats émanant de nos travaux sont présentés dans la seconde partie du manuscrit intitulée «Développement de vaccins poxviraux recombinants exprimant différents gènes du virus de la Fièvre Catarrhale Ovine et Evaluation de l'immunogénicité induite chez les petits ruminants». Le chapitre 3 est consacré au travail de biologie moléculaire réalisé pour la construction des virus recombinants, le

chapitre 4, aux expérimentations animales permettant d'évaluer les réponses immunitaires et la protection engendrée par ces virus recombinants. Le cinquième et dernier chapitre de cette seconde partie est consacré au développement d'un vecteur capripoxvirus recombinant co-exprimant deux gènes du virus de la FCO.

La dernière partie du manuscrit fait la synthèse des travaux par une discussion générale suivie de perspectives.

PARTIE I : ETAT DES CONNAISSANCES

Chapitre 1 - La Fièvre Catarrhale Ovine

La Fièvre Catarrhale Ovine (FCO) ou BlueTongue (BT) est une maladie animale virale, infectieuse, non contagieuse, transmissible qui affecte les ruminants domestiques ou sauvages. Elle est à déclaration obligatoire en Europe. C'est dans l'espèce ovine que la maladie peut revêtir toute sa gravité. Les bovins, caprins ainsi que les ruminants sauvages présentent plus rarement des manifestations cliniques (Lefèvre, 2003).

Le virus responsable de la FCO, ou BTV (Bluetongue Virus), appartient à la famille des *Reoviridae*, et au genre *Orbivirus*. Il s'agit d'un virus nu à ARN double brin segmenté avec à l'heure actuelle 24 sérotypes ou variants génétiques décrits.

La transmission de la maladie se fait essentiellement par l'intermédiaire de moucheron hémaphages du genre *Culicoides* (*Diptera* : *Ceratopogonidae*).

1 - Historique

La FCO est observée pour la première fois en 1880, en Afrique du Sud, sur un troupeau importé de moutons de race mérinos (Hutcheon, 1881). C'est également Hutcheon, en 1902, qui fait la première description de la maladie sous le nom de *Malarial catarrhal fever of sheep* (Hutcheon, 1902 ; Erasmus, 1985 ; Verwoerd & Erasmus, 1994), puis Spreull, de manière plus détaillée, en 1905 sous le nom de bluetongue (Spreull, 1902 ; 1905). L'origine virale de la maladie ainsi que les espèces sensibles ont été définies dès 1905 par Theiler (Theiler, 1906). C'est également à Theiler que l'on doit le premier vaccin atténué après plusieurs passages sur moutons (Theiler, 1908 ; Howell, 1960 ; 1970). En 1948, Neitz met en évidence l'existence de plusieurs sérotypes viraux au travers d'études de protections croisées chez le mouton (Neitz, 1948). Les avancées technologiques ont permis d'améliorer les connaissances concernant l'agent pathogène ; ainsi dans les années 1940, le virus de la FCO a été isolé et amplifié sur œufs embryonnés (Mason *et al.*, 1940 ; Alexander, 1947) puis en 1956, sur lignées cellulaires (Haig *et al.*, 1956). L'implication du rôle vecteur de *Culicoides imicola* connu également sous la dénomination de *C. pallidipennis* est établie en 1944 par Du Toit (Du Toit, 1944) ; depuis, la capacité de transmission du virus de la FCO a été démontrée pour de nombreuses autres espèces de *Culicoides*. La maladie s'est limitée au continent africain jusque dans les années 1940 puis s'est étendue à partir de 1943 dans le bassin méditerranéen (Chypre, Israël, Turquie, Syrie, Oman, Arabie

Saoudite), et l'Asie (Inde, Chine, Pakistan, Japon, Indonésie, Malaisie) (Verwoerd & Erasmus, 1994). La maladie est signalée sur le continent américain dès les années 1950. Actuellement, la FCO est retrouvée sur tous les continents.

2 - Epidémiologie et impact économique

Décrite pour la première fois en 1881 en Afrique du Sud, la FCO s'est rapidement étendue, à partir de 1940, en Afrique centrale pour atteindre le bassin méditerranéen et l'Asie. On la retrouve également de manière endémique en Amérique du Nord (USA, Canada), Amérique Centrale, Amérique du Sud (Mexique, Chili, Brésil, Guyane), Australie et Nouvelle-Zélande. Dans la littérature, la FCO est traditionnellement décrite comme une maladie présente sur tous les continents dans une zone géographique comprise entre des latitudes de 40°- 50° Nord et 20°- 30° Sud (Lefèvre, 2003). En revanche, les sérotypes ne sont pas représentés de manière uniforme sur tous les continents. Depuis les années 1950, la FCO fait de régulières apparitions dans le sud de l'Europe, au Portugal et en Espagne de 1957 à 1960, à Chypre en 1977, en Grèce en 1980. Plus récemment, en 1998, cette maladie est réapparue en Grèce, puis en 1999 en Bulgarie, Tunisie et Turquie ; en 2000 en Tunisie, Algérie, Italie (Sardaigne, Sicile et Calabres), Espagne (îles Baléares), et en France (Corse) (Zientara *et al.*, 2000 ; 2002). La propagation de la maladie en Europe a suivi deux voies : une première introduction du virus par l'Asie (sérotypes 9, 16) et une seconde par le Maghreb (sérotypes 1, 2, 4). La maladie s'est également étendue vers le Nord et a sévi en Bulgarie, au Kosovo et en Serbie (Purse *et al.*, 2005). En août 2006, plusieurs dizaines de foyers ont été diagnostiqués pour la première fois dans le Nord de l'Europe, Allemagne, Belgique, Hollande et France (OIE, 2006). Le sérotype incriminé est le sérotype 8 (Toussaint *et al.*, 2007a). Une des caractéristiques de cette épizootie est la pathologie sévère observée chez les bovins (Thiry *et al.*, 2006). En revanche, en 2007, les ovins sont autant affectés que les bovins et présentent une pathologie beaucoup plus sévère avec des taux de mortalités élevés (Cêtre-Sossah, communication personnelle). L'origine de l'infection par ce nouveau sérotype, jusqu'alors inexistant dans le bassin méditerranéen, est inconnue. De plus, une espèce de *Culicoides* locale décrite comme vecteur potentiel semble avoir pris le relais du vecteur avéré, *C. imicola*, absent dans cette zone. Ainsi, *C. dewulfi* est incriminé comme le vecteur principal de la maladie au

cours de cette épizootie (OIE, 2007). Toutefois, des études plus complètes sont nécessaires pour conclure de façon définitive.

La figure 1 fait un état des lieux de la répartition géographique actuelle de la maladie dans le monde entier. Les raisons de ces changements dans l'épidémiologie de la FCO sont complexes et sont liées à différents facteurs notamment à de récentes extensions de la distribution de son vecteur majeur, *C. imicola*, mais aussi à l'implication de nouveaux insectes vecteurs du genre *Culicoides* qui peuvent donc servir de relais. De plus, on peut s'attendre à ce que les hausses de températures annoncées favorisent la colonisation progressive de nouvelles régions européennes plus septentrionales. Il a été suggéré que la hausse des températures favoriserait à la fois une augmentation de la compétence vectorielle dans les populations de *Culicoides* vecteurs (Mullens *et al.*, 1995 ; Wittmann *et al.*, 2002) mais également la capacité de transmission chez des espèces habituellement réfractaires à l'infection (Mellor *et al.*, 2000).

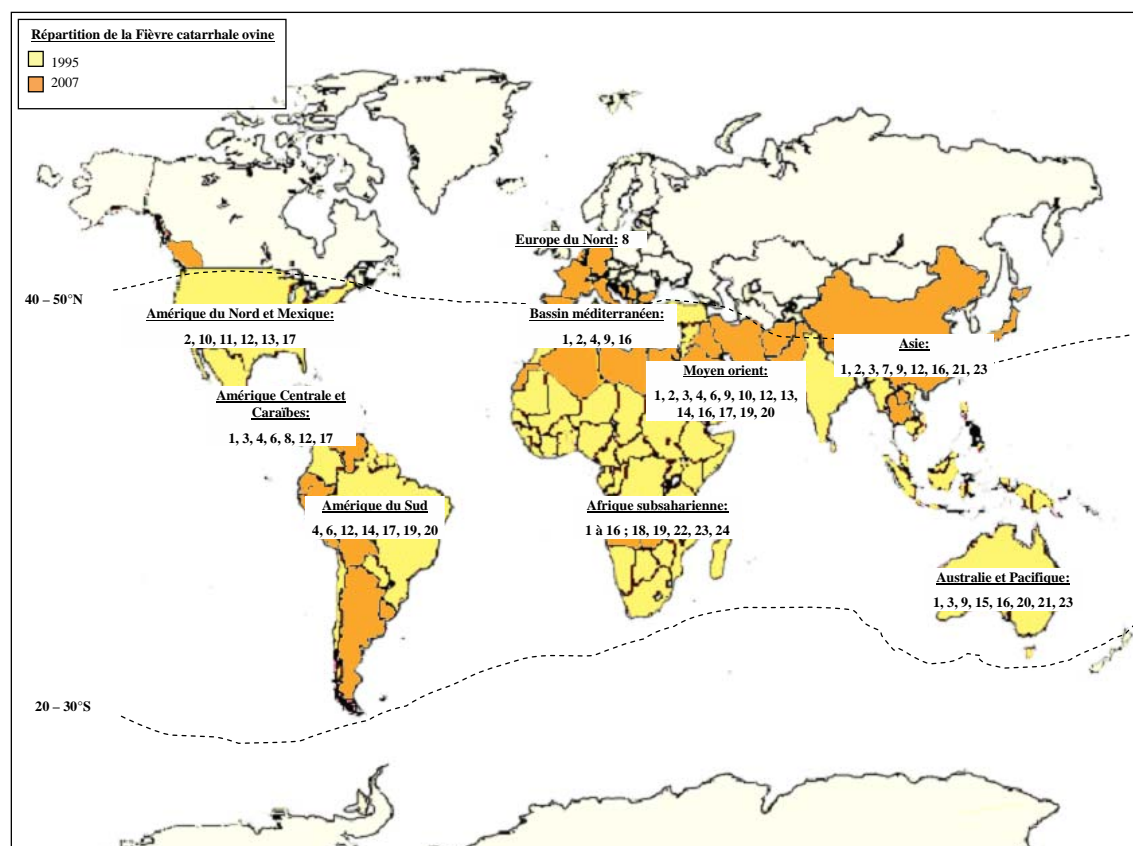


Figure 1 - Carte de répartition de la fièvre catarrhale ovine. Les sérotypes incriminés sont précisés pour chacune des zones géographiques. Adapté de Barber, 1979 ; Gibbs & Greiner, 1988 ; Dulac *et al.*, 1989 ; Dulac *et al.*, 1992 ; Gibbs & Greiner, 1994 ; Daniels *et al.*, 1995 ; Sharifah *et al.*, 1995 ; Clavijo *et al.*, 2002 ; Lefèvre, 2003.

La FCO est une maladie engendrant un coût économique important dans les pays où elle sévit. Lors de l'épizootie de 1943, à Chypre, des pertes allant jusqu'à 60 à 70% dans certains cheptels ont été observées (Gambles, 1949). En 1956, au cours d'une épizootie au Portugal et en Espagne, la mortalité ovine relevée dans les quatre premiers mois dépassait plus de 46 000 cas au Portugal et 133 000 en Espagne (Roberts, 1990).

Dans les pays où la maladie est endémique, la vaccination représente également un coût important. En revanche, dans le Nord de l'Europe, où le sérotype 8 circule activement et en l'absence de vaccin adapté, des mesures de lutte contre la FCO ont été prises pour prévenir toute diffusion, à partir des foyers confirmés, notamment par des restrictions importantes des mouvements de ruminants. Cette mesure provoque des pertes économiques importantes pour les éleveurs situés dans les périmètres de sécurité concernés par les interdictions d'exportations.

3 - Etiologie

Le virus responsable de la FCO est un virus de la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus* (Borden *et al.*, 1971). En 1959, Sabin proposa de regrouper au sein d'un groupe spécifique, des virus, jusqu'ici classés dans le groupe des échovirus, isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire, mais qui n'étaient pas liés à des entités cliniques définies (Sabin, 1959). Il proposa le nom de Réovirus pour virus Respiratoires, Entériques, et Orphelins. Cette famille s'est progressivement enrichie de virus apparentés et est aujourd'hui composée de 15 genres infectant aussi bien, les vertébrés, les invertébrés que les plantes: les *Orbivirus*, les *Orthoreovirus*, les *Rotavirus*, les *Coltivirus*, les *Aquareovirus*, les *Cypovirus*, les *Fijivirus*, les *Phytoreovirus*, les *Oryzavirus*, les *Seadornavirus*, les *Idnoreovirus*, les *Mycoreovirus*, les *Mimireovirus*, les *Cardoreovirus* et les *Dinovernavirus* (Mertens *et al.*, 2005). Le genre *Orbivirus* inclut 19 espèces dont le virus de la FCO (BTV – Bluetongue Virus) et le virus de la peste équine africaine (AHSV – African Horse Sickness Virus). Ces virus sont stables à -70°C, +4°C et à température ambiante, en revanche ils perdent de leur pouvoir infectieux à -20°C. Les *Orbivirus* sont divisés en sérogroupes sur la base d'un antigène commun localisé au niveau de la capside interne, ce qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément (Albina *et al.*, 2007 – annexe 2). Actuellement, 14 sérogroupes distincts ont été identifiés (tableau 1). Chaque séro groupe est divisé en sérotypes (Gould & Hyatt, 1994).

Sérogroupe	Nombre de sérotypes	Hôtes vertébrés	Invertébrés vecteurs
Virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (FCO)	24	Ruminants domestiques ou sauvages	<i>Culicoides</i>
Virus de la maladie hémorragique épizootique du Cerf (EHDV)	8	Cervidés, chameaux, bovins	<i>Culicoides</i>
Virus Eubenberg	4	Inconnu	Moustiques (<i>Aedes</i>)
Virus de la peste équine africaine (AHSV)	9	Equidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, ovins, caprins	<i>Culicoides</i> , moustiques et tiques (occasionnels)
Virus de l'encéphalite équine (EEV)	7	Chevaux, humains	Moustiques
Virus Warrego	2	Marsupiaux	<i>Culicoides</i>
Virus Wallal	2	Marsupiaux	<i>Culicoides</i>
Virus Palyam	11	Bovins, ovins	<i>Culicoides</i> , Phlébotomes
Virus Changuinola	12	Humains, rongeurs	<i>Culicoides</i> , Phlébotomes
Virus Corripata	4	Humains, rongeurs	Moustiques
Virus Kemerovo	40	Humains, rongeurs, bovins, ovins, oiseaux	Tiques
Virus Umatilla	3	Oiseaux	Moustiques
Virus Orungo	4	Humains, chameaux, bovins, caprins, singes, ovins	Moustiques
Virus Lebombo	1	Humains, rongeurs	Moustiques

Tableau 1 - Classification des différents sérogroupe appartenant au genre *Orbivirus*. Adapté de Albina et al., 2007.

3-1 - Morphologie et structure

Les virions sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique dont la taille varie entre 60 et 80 nm. Cette dernière est constituée d'une capsidie externe et d'une capsidie interne (ou core) d'une taille de 54 nm, consistant en un assemblage de 32 capsomères arrangés en structure icosaédrique (Els & Verwoerd, 1969). Le nom de genre *Orbivirus* provient de la structure des virions (*orbis* = anneau en latin). Le génome viral, logé au sein de la capsidie interne, est composé de 10 segments d'ARN double brin de tailles différentes. La taille totale du génome est d'environ 19200 bases. Le tableau 2 présente les caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO ainsi que leurs produits d'expression. Les protéines peuvent être classées en deux catégories, les protéines structurales (VP1 à VP7) et les protéines non structurales (NS1 à NS3) (Verwoerd, 1969). Une représentation schématique de la structure du virus de la FCO est donnée en figure 2. La capsidie externe est composée de 2 protéines structurales majeures VP2 et VP5, représentant 43% de la masse totale des protéines (Gould, 1988). La protéine VP2, constituant majeur de la capsidie externe, est la protéine la moins conservée de toutes les protéines (Mertens *et al.*, 1987a ; Roy, 1989) et est l'antigène spécifique de type (Mertens *et al.*, 1987b ; Cowley & Gorman, 1989 ; Mertens *et al.*, 1989 ; Roy, 1989 ; Huismans & Van Disjk, 1990). La capsidie interne (ou core) est composée de deux protéines structurales majeures, VP7 et VP3 et de trois protéines structurales mineures, VP1, VP4 et VP6 (Howell, 1960 ; Huismans *et al.*, 1987a, Mertens *et al.*, 1987a ; Huismans & Van Disjk, 1990). La nucléocapsidie est constituée de 32 capsomères tubulaires (Els & Verwoerd, 1969) composés par la protéine VP7. La protéine VP7 est le composant majeur de la capsidie interne du virus et possède également des déterminants antigéniques de groupe (Gumm & Newman, 1982 ; Roy, 1989 ; Huismans & Van Disjk, 1990). La matrice (ou subcore) est composée par la protéine VP3, qui interagit de manière forte avec les trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6 (Grimes *et al.*, 1998 ; Gouet *et al.*, 1999) ; ces trois dernières constituant le complexe de transcription (Albina *et al.*, 2007). La protéine VP3 est une protéine qui possède des déterminants antigéniques spécifiques du groupe (Iwata *et al.*, 1992 ; Roy, 1992a).

Segments (taille en pb)	Protéines	Masse molaire (Da) ^{1,2}	Localisation ^{4,5,6,7}	Nombre de molécules par virion ^{3,4}	Propriétés
1 (3954)	VP1	149 588	Protéine mineure de la capside interne	11	Antigène de groupe ARN polymérase ARN dépendante ^{8,9}
2 (2926)	VP2	111 112	Protéine majeure de la capside externe	180	Spécificité de type ^{4,7,10,11,12} Antigène protecteur ¹³ Ligand récepteur cellulaire ^{7,13} Protéine la plus variable ^{7,12}
3 (2770)	VP3	103 344	Protéine majeure de la capside interne	120	Antigène de groupe Contrôle la taille et l'organisation de la structure de la capside ^{14,15} Interagit avec les protéines mineures du subcore ^{14,15}
4 (1981)	VP4	76 433	Protéine mineure de la capside interne	9	Guanylyltransferase ¹⁶
5 (1769)	NS1	64 445	Protéine non structurale	0	Forme des tubules dans le cytoplasme des cellules ^{17,18}
6 (1638)	VP5	59 163	Protéine majeure de la capside externe	292	Spécificité de groupe ^{7,10,11}
7 (1156)	VP7	38 548	Protéine majeure de la capside interne	780	Intervient dans l'entrée dans la cellule ^{19,20} Antigène de groupe ^{3,12,21}
8 (1124)	NS2	40 999	Protéine non structurale	0	Associée aux corps d'inclusion ^{22,23} Fixe les ARN messagers ²⁴
9 (1046)	VP6	35 750	Protéine mineure de la capside interne	67	Antigène de groupe Fixe les ARN sb et db ²⁵ Hélicase ²⁶
10 (822)	NS3/NS3A	25572 / 24020	Protéines non structurales	0	Glycoprotéine ^{27,28} Libération des virions ^{29,30}

Tableau 2 - Caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO.

Adapté de ¹ Roy, 1992a ; ² Roy, 1989 ; ³ Huisman & Vandsijk, 1990 ; ⁴ Pedley *et al.*, 1988 ; ⁵ Hewat *et al.*, 1992a ; ⁶ Mertens *et al.*, 1984 ; ⁷ Mertens *et al.*, 1987a ; ⁸ Roy *et al.*, 1988 ; ⁹ Urakawa *et al.*, 1989 ; ¹⁰ Cowley & Gorman, 1989 ; ¹¹ Mertens *et al.*, 1989 ; ¹² Roy *et al.*, 1989 ; ¹³ Huisman *et al.*, 1987a ; ¹⁴ Gouet *et al.*, 1999 ; ¹⁵ Grimes *et al.*, 1998 ; ¹⁶ Le Blois *et al.*, 1992 ; ¹⁷ Hewat *et al.*, 1992b ; ¹⁸ Huisman & Els, 1979 ; ¹⁹ Mertens *et al.*, 1996 ; ²⁰ Xu *et al.*, 1997 ; ²¹ Gumm & Newman, 1982 ; ²² Brookes *et al.*, 1993 ; ²³ Thomas *et al.*, 1990 ; ²⁴ Kar *et al.*, 2007 ; ²⁵ Theron *et al.*, 1994 ; ²⁶ Roy *et al.*, 1990a ; ²⁷ Stauber *et al.*, 1997 ; ²⁸ Wu *et al.*, 1992 ; ²⁹ Bansal *et al.*, 1998 ; ³⁰ Hyatt *et al.*, 1993.

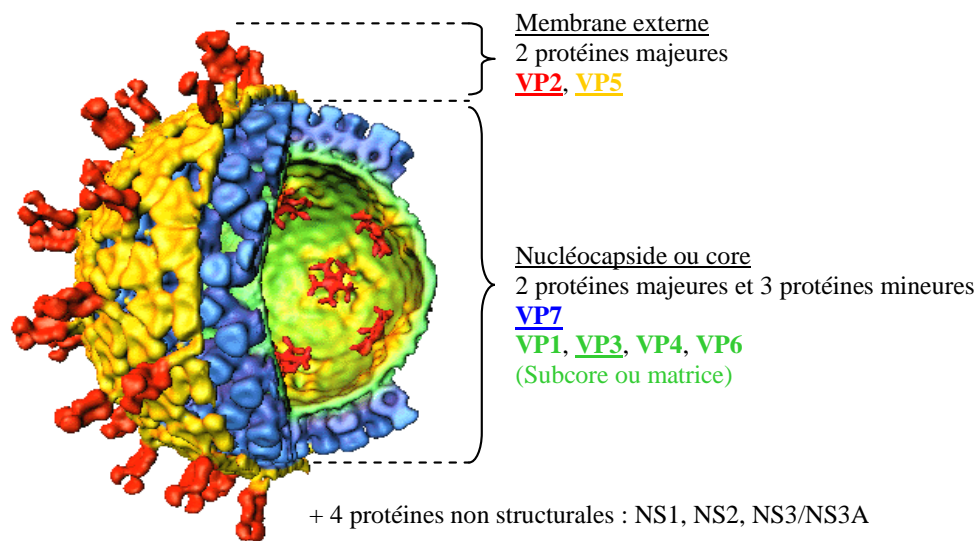


Figure 2 - Représentation schématique de la structure du virus de la FCO. Adapté de Lefèvre, 2003.

Quatre protéines non structurales, NS1, NS2 et NS3/NS3A sont produites lors de la multiplication du virus dans la cellule sans être incorporées aux virions. La protéine NS1 est produite en très grande quantité et s'accumule dans les cellules pour donner naissance à des structures tubulaires dans le cytoplasme (Huismans & Els, 1979 ; Hewat *et al.*, 1992b). NS2 est une phosphoprotéine (Modrof *et al.*, 2005) qui jouerait un rôle dans l'organisation du génome avant encapsidation. Le segment 10 code pour deux protéines non structurales NS3 et NS3A. Ces dernières seraient associées aux derniers stades de la morphogenèse des virions (Hyatt *et al.*, 1991) et joueraient un rôle dans la libération des virions néoformés (Hyatt *et al.*, 1993).

La nature segmentée du génome permet le réassortiment entre segments lors de co-infections. De plus, le génome viral subit un taux élevé de mutations contribuant à une variation génétique. Ces particularités expliquent la variabilité antigénique du virus de la FCO au travers de ses 24 sérotypes décrits.

3-2 - Immunogénicité des protéines

Exposées à la surface de la particule virale, les protéines de structure VP2 et à moindre degré VP5, sont les antigènes cibles des anticorps neutralisants spécifiques de type (Huismans & Erasmus, 1981 ; Jeggo *et al.*, 1984a ; Huismans *et al.*, 1987 ; Mertens

et al., 1987b ; Pierce, 1995). L'immunité cellulaire est induite par la protéine majeure de la capside interne VP7 ainsi que par les protéines non structurales NS1 et NS2 (Jeggo & Wardley, 1982a ; 1982b ; 1982c ; Jeggo *et al.*, 1983 ; 1984b ; 1985 ; Jeggo & Wardley, 1985 ; Andrew *et al.*, 1995 ; Wade-Evans *et al.*, 1996 ; Jones *et al.*, 1997). Ces dernières s'accumulent en grande quantité pendant la réplication virale et génèrent respectivement des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) chez le mouton et chez la souris. La protéine non structurale NS3, s'accumule également en grande quantité lors de la réplication du virus mais aucune information n'est connue quand à la réponse immunitaire engendrée.

3-3 - Cycle de réplication

La réplication du virus de la FCO, chez les mammifères, s'effectue dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales puis le virus est libéré dans le sang circulant. Dans un premier temps, le virion s'attache à la membrane cellulaire par l'intermédiaire de la protéine VP2. La protéine d'attachement du virus aux cellules de *Culicoides* est la protéine VP7 (Mertens *et al.* 1996 ; Xu *et al.*, 1997 ; Tan *et al.*, 2001). L'interaction de la protéine VP2 avec son ligand cellulaire déclenche l'internalisation du virus (Hassan & Roy, 1999) par invagination de la membrane cellulaire. Les vacuoles d'endocytose, nouvellement formées, fusionnent avec des lysosomes et permettent ainsi l'activation d'une transcriptase virale (Huisman *et al.*, 1987a). L'induction de la transcription est effectuée dans les virions décapsidés. Dans la particule virale, les ARN bicaténaires (ARN db) sont associés aux complexes de transcription constitués par les protéines VP1, VP4 et VP6. La réplication de l'ARN s'effectue au niveau de ces complexes et les ARN néo-synthétisés sont libérés par les pores situés aux sommets de la particule icosaédrique (Urbano & Urbano, 1994). La protéine VP1, constituant l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus, transcrit les brins négatifs d'ARN db en ARN messagers précoces coiffés et polyadénylés par la VP4, qui serviront à la synthèse des protéines et de matrice à la synthèse des ARN négatifs. La protéine VP6 possède des séquences en acides aminés communes aux hélicases et pourrait jouer un rôle dans l'encapsidation des ARN db (Roy, 1992a). La protéine NS2 se fixe aux ARN simples brins et interviendrait dans la réplication. Une traduction d'ARNm tardifs non coiffés se met alors en place et aboutit à la synthèse des protéines structurales. Les protéines VP3 synthétisées forment dans le cytoplasme une particule instable à géométrie icosaédrique.

Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent avec cette structure dans laquelle les ARN db sont encapsidés. La protéine VP7 se fixe, sous forme de trimère, à la surface de cette capsid interne afin d'en rigidifier la structure. Les protéines VP2 et VP5 constituent finalement la capsid externe (Albina *et al.*, 2007). Les protéines NS3 et NS3A sont ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane plasmidique. Ces protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement (Hyatt *et al.*, 1993 ; Beaton *et al.*, 2002).

4 - La maladie

Le virus de la FCO infecte naturellement les ruminants domestiques et sauvages. Les symptômes sont visibles principalement chez les ovins et préférentiellement sur des races améliorées, comme les races corses, sardes ou les mérinos (Zientara & Gourreau, 2001). La plupart des autres espèces de ruminants déclarent une forme asymptomatique ; seule la présence d'anticorps traduisant une séroconversion due au virus de la FCO est alors mise en évidence.

4-1 - Pathogénie

L'infection des hôtes vertébrés produit une première virémie discrète et permet la localisation primaire du virus dans la rate, les amygdales et les noeuds lymphatiques régionaux. La charge virale est beaucoup plus élevée durant la seconde virémie, ce qui permet la détection du virus, l'infection d'autres vecteurs hématophages et la dissémination du virus dans de nombreux tissus. Le virus se multiplie dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales au sein d'une variété de tissus et provoque la dégénérescence et la nécrose de l'endothélium vasculaire. C'est l'atteinte des cellules endothéliales qui entraîne une fragilité capillaire avec hémorragies et oedèmes et explique les lésions observées (Lefèvre, 2003). Le virus se dissémine dans l'organisme par une virémie associée aux cellules sanguines pouvant durer plusieurs semaines, même en présence d'anticorps neutralisants.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la durée ainsi que la charge virale présente dans le sang périphérique, tels que le sérotype impliqué ou l'espèce animale considérée.

Singer *et al.* (2001) ont analysé un grand nombre de données et ont conclu que la durée de la virémie chez les bovins n'excédait pas 9 semaines dans 99% des cas. L'épizootie ayant eu lieu dans le Nord de la France a montré des durées de virémie très variables, allant de 8 à 22 semaines pour certains animaux (Zientara, communication personnelle). Chez les ovins, la durée maximale de virémie observée est de 54 jours (Koumbati *et al.*, 1999) mais elle se situe en moyenne entre 8 jours et 30 jours (Lefèvre, 2003). En ce qui concerne les caprins, peu d'études ont été menées mais d'après Verwoerd & Erasmus, 1994, la virémie n'excèderait pas 3 semaines.

4-2 - Symptômes

4-2-1 - Pathologie observée chez les ovins

Trois formes de pathologie peuvent être observées chez les ovins ; une forme aiguë, une forme subaiguë et une forme inapparente. La forme subaiguë, rare en Europe, se rencontre presque exclusivement dans les zones d'enzootie, chez des races rustiques et se traduit par une symptomatologie atténuée. La forme inapparente se rencontre chez des races rustiques en zones d'enzootie et se traduit par une absence de signes cliniques.

Dans le cas de la forme aiguë, après une période d'incubation moyenne de 2 à 6 jours, avec un maximum de 18 jours, les animaux présentent en tout premier lieu une hyperthermie pouvant atteindre 42°C ainsi qu'un abattement (Figure 3a) pendant 4 à 8 jours. Dans les jours qui suivent sont observés des phénomènes congestifs, oedémateux et hémorragiques (Lefèvre, 2003):

- Congestions et hémorragies punctiformes accompagnées d'hypersalivation, évoluant vers l'ulcération et la nécrose sur les lèvres et le museau, dans la cavité buccale (Figure 3b).
- Oedèmes des lèvres, de l'auge et de la langue, qui peuvent s'étendre à l'ensemble de la tête (Figure 3c). La langue peut devenir alors cyanotique (d'où le nom de « Bluetongue ») (Figure 3d).
- Ptyalisme important, consécutif à la présence de lésions buccales (Figure 3e). La salive devient vite sanguinolente et nauséabonde.
- Jetage et épiphora séro-muqueux puis rapidement muco-purulent abondants conduisant à la formation de croûtes.

- Anorexie (Figure 3f).

A partir du sixième jour, des arthrites ainsi que des lésions congestives puis ulcéraives du bourrelet coronaire des onglons entraînent des boiteries prononcées. Une myosite dégénérative entraîne raideur des membres, torticolis (Figure 3g), cyphose et fonte musculaire. La congestion de la peau peut se généraliser, et entraîner une chute de la laine en quelques semaines (Figure 3h).

La mortalité survient dans les 10 à 12 jours en moyenne après le début de la maladie. Si l'animal résiste, la guérison est lente et de nombreuses séquelles peuvent persister telles que de la stérilité, de l'alopecie ou des retards de croissance. Le taux de morbidité est de 80 à 100% chez les ovins pleinement réceptifs ; le taux de mortalité est variable, se situant entre 2 et 20% et est le plus souvent engendré par des maladies intercurrentes.

Le passage transplacentaire du virus peut également provoquer des pertes chez les femelles gestantes. Si l'infection a lieu lors du premier tiers de la gestation, il entraîne une mortalité embryonnaire et fœtale (Zientara *et al.*, 2000). Lors du second tiers, il y a des anomalies congénitales, hydranencéphalies. Au cours du dernier tiers de gestation, le fœtus ou l'agneau développe une réponse immune contre l'infection virale.

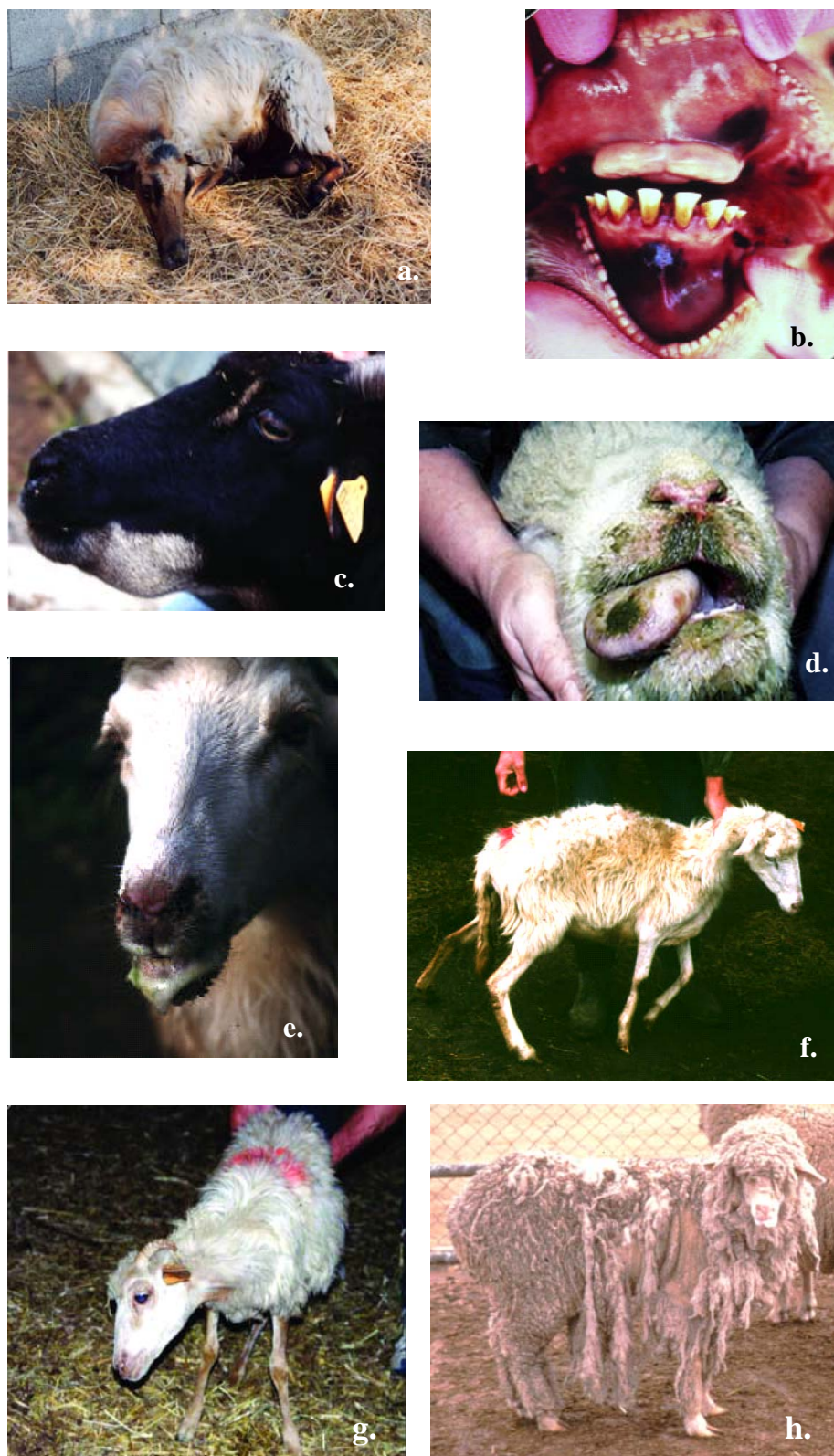


Figure 3 - Symptômes observés chez des moutons atteints d'une forme aiguë de la FCO. **a.** Apathie (Photo J. Santolini), **b.** Hémorragies en nappe dans toute la cavité buccale (Photo P.C. Lefèvre), **c.** Volumineux œdème sous glossien (Photo J.M. Gourreau), **d.** Cyanose de la langue (Photo IAH), **e.** Ptyalisme signalant la présence de lésions buccales (Photo J.M. Gourreau), **f.** Amaigrissement dû à une fonte musculaire (Photo J.M. Gourreau), **g.** Torticolis engendré par une myosite dégénérative (Photo J.M. Gourreau), **h.** Perte de la laine suite à une congestion de la peau (Photo FAO).

4-2-2 - Pathologie observée chez les bovins et les caprins

Dans les espèces bovines et caprines, l'infection généralement inapparente, se limite à une hyperthermie transitoire. Ainsi, aucun signe clinique n'est observable et seule la présence d'anticorps témoigne alors de l'infection des animaux. Toutefois, dans 5% des cas, une forme aiguë peut se manifester chez les bovins par des signes cliniques tels qu'une hypersalivation accompagnée de dyspnée, une inflammation des muqueuses, des ulcérations de la muqueuse buccale et nécrose de l'épithélium du mufle (Albina *et al.*, 2007). Pendant l'été 2006, le virus de la FCO a provoqué une épizootie dans la région de Maastricht (Pays-Bas) et de Liège (Belgique). Les bovins ont présenté des lésions nécrotiques sur le mufle et les gencives (figures 4a et 4b), du jetage muco-hémorragique, un larmoiement avec œdèmes des paupières et de l'auge, des lésions congestives sur les mamelles (figure 4c) (Zientara *et al.*, 2006). Le taux de morbidité varie entre 0,4 et 30% et le taux de mortalité semble très faible. De plus, en raison de son passage transplacentaire, le virus provoque des avortements et des malformations congénitales chez les veaux infectés *in utero*. Chez les caprins, peuvent être observés très occasionnellement de l'hyperthermie transitoire associée à une faiblesse de l'animal, des avortements et des malformations congénitales.

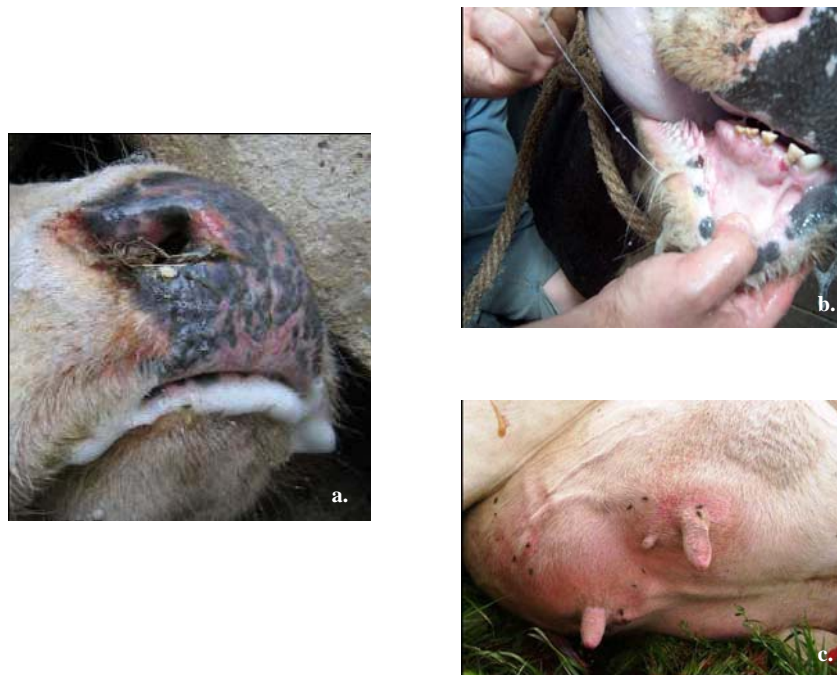


Figure 4 - Symptômes observés chez des bovins atteints de FCO. **a.** Lésions nécrotiques sur le mufle (Photo de G.D. Deventer), **b.** Lésions nécrotiques sur les gencives (Photo DDSV des Ardennes), **c.** Lésions congestives des mamelles (Photo Université de Liège, Belgique).

4-2-3 - Pathologie observée dans la faune sauvage

Des études sérologiques ont montré que dans la faune sauvage africaine, de nombreuses espèces de mammifères (notamment buffles, grands koudous, impalas et springboks) possédaient des anticorps contre le virus de la FCO sans présenter aucun signe clinique. Il en est de même en Amérique du Nord où des cerfs muets et wapitis, ont été trouvés séropositifs (Taylor, 1986 ; MacLachlan, 1994 ; Johnson *et al.*, 2006). En Corse, des cerfs en captivité ont présenté des taux élevés de séroconversion (Zientara, 2006).

4-3 - Diagnostic

4-3-1 - Diagnostic clinique

Chez les ovins, la FCO peut-être diagnostiquée cliniquement lors de l'observation de syndromes fébriles associés à des lésions des muqueuses oro-nasales. Dans les autres espèces (bovines ou caprines), le diagnostic clinique est plus difficile (Albina *et al.*, 2007). En effet, la FCO peut être confondue avec plusieurs autres maladies provoquant des symptômes assez proches tels que l'ecthyma contagieux dû à un poxvirus et provoquant des lésions péri-buccales de nature papulo-croûteuse ou ulcéraire. Cependant des vésiculopustules ou des nodules sont observées sur l'ensemble du corps et cette infection ne provoque pas d'œdème. La fièvre aphteuse en raison des lésions buccales et podales qu'elle provoque devrait être suspectée de façon systématique. Les lésions de fièvre aphteuse sont cependant beaucoup moins prononcées que lors d'un épisode de FCO et surtout ne sont pas accompagnées d'œdèmes. La FCO peut également être confondue avec la nécrobacillose qui provoque des ulcères profonds chez des animaux dénutris ou immunodéprimés et avec des allergies dues aux piqûres d'insectes qui se caractérisent par des papules œdémateuses puis par des vésicules et ulcères superficiels (Albina *et al.*, 2007). Dans les pays tropicaux, la FCO peut également être confondue avec la peste des petits ruminants affectant les caprins et les ovins (Lefèvre, 2003).

4-3-2 - Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire intervient à la fois pour confirmer les suspicions cliniques mais aussi pour déterminer le sérotype incriminé. Le diagnostic virologique consiste à mettre en évidence le virus (diagnostic conventionnel) ou son génome (diagnostic moléculaire). Le diagnostic sérologique permet quant à lui, non seulement de détecter la présence d'anticorps, signant alors une infection ou une vaccination, mais également de rechercher le sérotype incriminé lors d'une épizootie. La recherche du virus, en cas de suspicion, se fera à partir de 5 ml de sang prélevé sur anticoagulant (EDTA) pendant la phase d'hyperthermie, correspondant à la phase de virémie maximale. Sur le cadavre frais, peuvent être prélevés la rate, le cœur et/ou les noeuds lymphatiques. Après acheminement des prélèvements au laboratoire, sous régime du froid, le virus pourra être isolé par inoculation sur œufs embryonnés de 9 à 11 jours (Clavijo *et al.*, 2000), puis dans un second temps sur culture cellulaire (cellules BHK21 ou VERO). Le typage peut être effectué, après isolement du virus, par neutralisation virale sur culture de cellules à l'aide des 24 sérums hyper immuns spécifiques produits sur ovins ou lapins par le laboratoire de référence international pour la FCO, l'Institute of Animal Health (IAH, Pirbright, Angleterre).

Des techniques plus rapides permettent de mettre en évidence le génome viral par son amplification. Les techniques de PCR conventionnelles permettent l'amplification de gènes hautement conservés tels que les segments 1, 5, 7 et 10 codant respectivement pour les gènes NS1, VP5, VP7 et NS3 (Bréard *et al.*, 2003). La PCR de type basée sur le segment 2, codant pour la protéine VP2, est spécifique de chaque sérotype et permet l'identification du sérotype incriminé (Zientara *et al.*, 2002). Ces techniques présentent une haute spécificité ainsi qu'une grande sensibilité. La détection quantitative du génome viral est désormais possible par la PCR en temps réel basée sur la technologie Taqman avec l'utilisation de fluorophores. Elle est basée sur les segments 1, 5 ou 10 (Orru *et al.*, 2006 ; Shaw *et al.*, 2007 ; Toussaint *et al.*, 2007b).

De nombreuses techniques permettant le diagnostic sérologique ont été mises au point mais seules trois d'entre elles sont recommandées par l'OIE (OIE, 2004) : l'immunodiffusion en gélose, l'ELISA de compétition qui est aujourd'hui le test plus utilisé (plusieurs kits sont commercialisés), et le test de neutralisation virale. Ces deux premières techniques permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles reposent sur la reconnaissance d'antigènes communs aux 24 sérotypes. Les analyses sérologiques se

font à partir de sang prélevé sur tube sec (5 ml environ). Dans les régions où les cheptels ovins sont vaccinés, la séropositivité peut-être attribuée à la détection d'anticorps post-vaccinaux. La neutralisation virale est utilisée pour identifier le sérotype en cause ou pour déterminer le ou les sérotypes contre lesquels un animal a été immunisé. Cependant, en raison des nombreuses réactions croisées entre sérotypes, l'interprétation de ce test peut être délicate.

5 - Le vecteur

La FCO est transmise essentiellement par l'intermédiaire d'insectes hématophages appartenant au genre *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) Latreille 1809. On parlera d'arbovirose, car il s'agit d'un virus transmis par des vecteurs arthropodes (arbovirus pour arthropod borne virus). Sur les 1254 espèces de *Culicoides* décrites mondialement, 33 sont, à ce jour, connues pour être impliquées dans la transmission du virus de la FCO (Mellor, 1990 ; Meiswinkel, 2004a). Ces insectes sont également impliqués dans la transmission de nombreuses autres maladies, humaines ou animales. Ainsi, ils sont responsables de la transmission de nématodes, de protozoaires (Linley, 1985) et de nombreux virus de la famille des *Bunyaviridae* (virus Akabane), *Rhabdoviridae* (virus de la stomatite vésiculeuse) et *Reoviridae* (virus de la peste équine africaine et de la fièvre hémorragique du cerf). L'importance médicale et vétérinaire des *Culicoides*, ainsi que les nuisances qu'ils occasionnent dans certaines régions du globe expliquent les nombreux travaux entrepris ces dernières années.

5-1 - Taxonomie et morphologie

La famille des *Ceratopogonidae* comprend environ 5500 espèces réparties en 125 genres dont le genre *Culicoides* (Mellor *et al.*, 2000). Ce dernier compte, à lui seul, plus de 1254 espèces (Beckenbach & Borkent, 2003) réparties en 25 sous-genres dont le genre *Avaritia* Fox, 1955 comprenant plusieurs espèces impliquées dans la transmission de la FCO. L'identification des espèces et la systématique en général, sont réalisées en fonction de ressemblances morphologiques sur la base d'une clé d'identification (Delécolle, 1985) et notamment grâce aux motifs alaires composés de zones claires et de zones sombres (figure 5). Lorsque le patron alaire ne permet pas une identification

précise de l'espèce, les spécimens doivent être disséqués et montés sur lames pour être identifiés microscopiquement. L'identification des femelles est basée sur la forme des spermathèques, l'espace inter oculaire, le nombre et l'arrangement des soies présentes sur les antennes. Pour les mâles, la forme du genitalia est généralement suffisante pour établir une identification spécifique (Meiswinkel *et al.*, 1994).

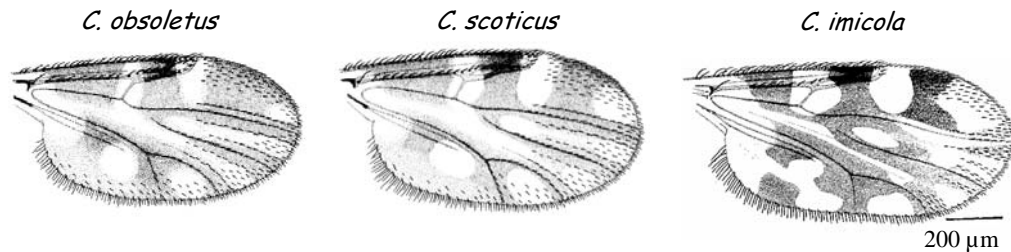


Figure 5 - Patrons alaires de *Culicoides obsoletus*, *Culicoides scoticus* et *Culicoides imicola*. Dessins de Jean-Claude Delécolle.

Les larves des différentes espèces de *Culicoides* sont difficilement identifiables sur le plan morphologique. Les outils d'identification moléculaire récemment développés à partir de différents marqueurs, cytochrome oxydase I (Linton *et al.*, 2002 ; Dallas *et al.*, 2003 ; Pagès *et al.*, 2005 ; Nolan *et al.*, 2007), cytochrome oxydase II (Beckenbach & Borkent, 2003), ITS-1 (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004 ; Perrin *et al.*, 2006 ; Mathieu *et al.*, 2007 ; cf. annexe 2), et ITS-2 (Gomulski *et al.*, 2006), représentent une aide précieuse à la taxonomie classique.

Au stade adulte, les *Culicoides* sont de petits insectes piqueurs mesurant entre 1 à 3 mm de long (Delécolle & Schaffner, 2003). La tête, de forme légèrement aplatie porte des antennes assez longues pourvues, chez les mâles, de longues soies couchées (figure 6).



Figure 6 - Photographie de *Culicoides imicola*. **a.** spécimen femelle gorgé de sang, **b.** spécimen mâle. http://www.unica.it/~animabiol/zoologia_lab_paras.html#.

5-2 - Biologie et distribution

Les *Culicoides* ont, généralement, une activité crépusculaire ou nocturne et les femelles sont pour la plupart hématophages ; leurs préférences trophiques variant en fonction des espèces (Delécolle & Schaffner, 2003). La transmission des pathogènes s'effectue lors du repas sanguin nécessaire à la maturation des œufs. Les étapes successives du cycle de développement d'un *Culicoides* sont représentées sur la figure 7. La ponte a lieu, en général, 2 jours après le repas de sang et les œufs éclosent dans les 3 à 5 jours suivants, si les températures sont favorables. Les gîtes larvaires sont extrêmement variés mais ont pour caractéristiques communes une humidité suffisante (larves aquatiques ou semi aquatiques) et la présence de matières organiques. Les œufs sont pondus au sol, sur des matières végétales, soit en décomposition (trous d'arbres, souches pourries, feuilles mortes...), soit recyclées par les animaux (bouses...). S'en suivent quatre stades larvaires, aquatiques ou semi aquatiques, dont la survie est inféodée à la présence de conditions environnementales adéquates. Les larves sont vermiformes, eucéphales et apneustiques. Le développement larvaire peut durer, selon l'espèce et les conditions du milieu, de 2 semaines à plusieurs mois. Les larves, se nourrissent de débris organiques divers, de bactéries, de protozoaires, de nématodes (Linley, 1979) et, parfois, de leurs congénères. Les larves peuvent entrer en hypobiose, si les conditions climatiques sont temporairement défavorables, et résister ainsi plusieurs mois. Au terme de leur développement, les larves remontent en surface et recherchent un support, où elles se transforment en nymphes (Delécolle & Schaffner, 2003). Les nymphes sont mobiles mais très peu actives et ne se nourrissent pas. La durée du stade nymphal est très courte. L'émergence de l'imago a lieu au bout de 2 à 10 jours.

L'activité des adultes est très fortement influencée par la température et est optimale entre 13°C et 35°C (Sellers, 1981). La longévité des adultes est estimée à environ 3 semaines. La survie et l'activité des *Culicoides* sont fortement liées aux températures. Ainsi, ils présentent une activité maximale à des températures avoisinant les 24°C, alors qu'ils arrêtent de voler en dessous de 15-18°C. Leur survie nécessiterait en moyenne des températures pour les mois les plus froids supérieures à 12,5°C (Mellor, 1990).

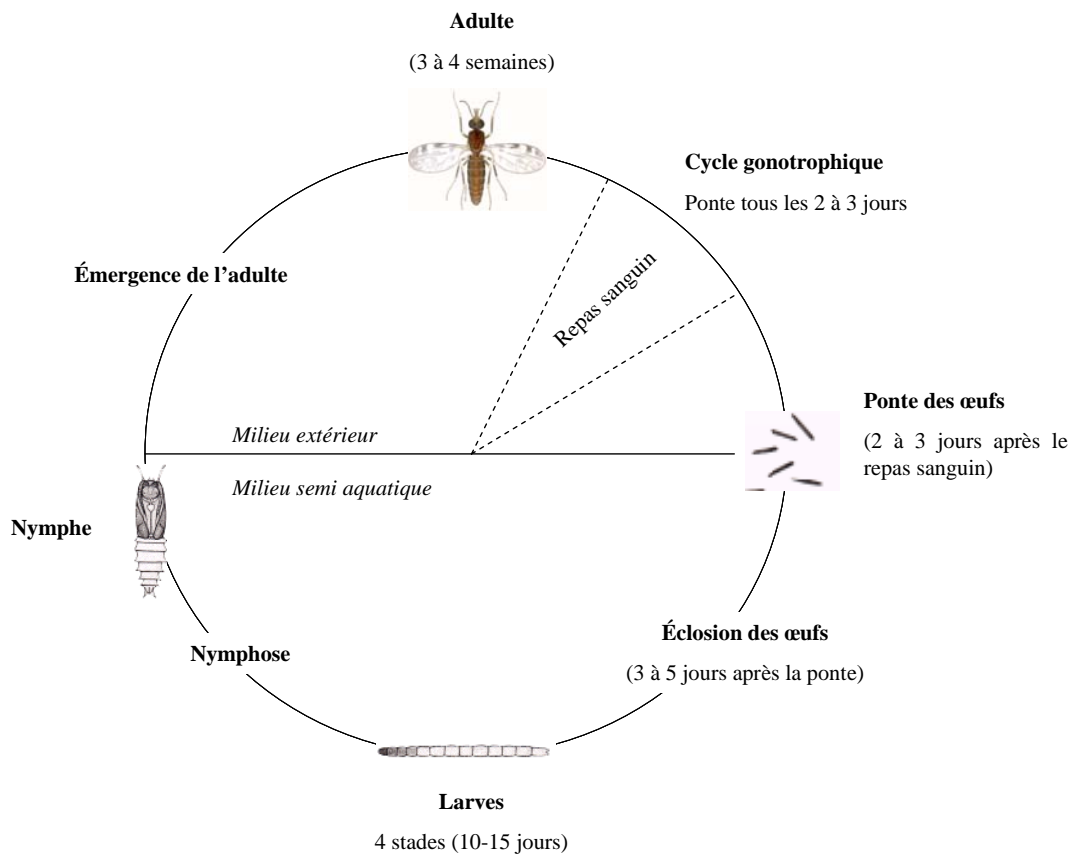


Figure 7 - Représentation schématique du cycle biologique des *Culicoides* spp. Adapté de Zenner, 1977.

Les *Culicoides* ont une large distribution géographique et ont colonisé tous les milieux exceptées les régions polaires, la Nouvelle Zélande, la Patagonie et les îles Hawaii (Meiswinkel *et al.*, 1994). La diffusion de ces insectes se fait beaucoup par transport passif, notamment par le vent (Seller, 1980). Ainsi des vols jusqu'à 700 km seraient possibles (Mellor *et al.*, 2000). De nombreuses études ont montré que l'introduction de nouvelles maladies était très fortement liée à des mouvements passifs de *Culicoides* (Sellers *et al.*, 1979 ; Mohammed & Taylor, 1987 ; Sellers & Maarouf, 1989 ; Homan *et al.*, 1990).

Culicoides (Avaritia) imicola est l'espèce la plus largement répandue ; on la retrouve notamment en Afrique, dans tous les pays bordant la Méditerranée ainsi qu'en Asie (Sri Lanka, Thaïlande, Laos et Vietnam) (Wirth & Hubert, 1989). La plupart des autres espèces ont une aire de répartition beaucoup plus restreinte, ceci est dû aux contraintes environnementales ainsi qu'à la spécificité des gîtes larvaires.

5-3 - Implication des *Culicoides* dans la transmission de la FCO

Dans les conditions naturelles, la capacité de transmission d'agents pathogènes, notamment du virus de la FCO, n'a été établie de manière définitive que pour quelques espèces de *Culicoides* et est suspectée pour d'autres espèces (Delécolle & Schaffner, 2003). Celle-ci est conditionnée par le vecteur lui-même, le virus, l'hôte et les conditions climatiques (Hardy *et al.*, 1983). Après avoir été ingéré par l'insecte lors du repas sanguin, le virus traverse la barrière intestinale et se multiplie dans l'hémocoel. Il diffuse ensuite dans l'organisme et atteint les glandes salivaires où un cycle de multiplication se déroule. La durée de la virémie, chez les hôtes vertébrés, est un facteur important dans la transmission du virus aux insectes. En l'absence de transmissions transovariennes chez les vecteurs (Sellers & Mellor, 1993), le maintien de l'infection (ou « overwintering ») dans les régions où les adultes disparaissent une partie de l'année s'explique par la longueur de la virémie chez les hôtes vertébrés (Takamatsu *et al.*, 2003 ; Purse *et al.*, 2006). Si l'hiver s'étend sur plus de 3 à 4 mois, l'infection ne peut se maintenir, les *Culicoides* adultes émergent au printemps se nourrissant sur des animaux non virémiques. En revanche, certaines études ont montré que la survie d'une partie de la population de vecteurs au cours de l'hiver était possible (Sellers & Mellor, 1993 ; Gerry & Mullens, 2000) et que le maintien de l'infection chez les hôtes invertébrés, serait également possible (White *et al.*, 2005). Il est donc possible de maintenir un cycle d'infection entre les vecteurs et leurs hôtes au cours de l'hiver.

La capacité vectorielle des *Culicoides* dépend également de facteurs environnementaux dont la température principalement (Mullens *et al.*, 1995). En effet, les basses températures diminuent le taux d'infection, la virogenèse, la fréquence des repas, et repoussent la date de la première piqûre infectante. A l'inverse, des températures élevées augmentent ces mêmes phénomènes et accélèrent les processus de réplication virale à l'intérieur de l'insecte (Gerry & Mullens, 2000). De plus, il a été suggéré que des températures élevées pourraient augmenter la capacité vectorielle d'espèces qui ne sont habituellement pas considérées comme vectrices (Wittmann, 1999). Seulement une trentaine d'espèces de *Culicoides* ont été incriminées dans la transmission du virus de la FCO (tableau 3) (Mellor, 1990 ; Meiswinkel, 2004).

Espèces	Localisations géographiques
<i>C. imicola</i>	Afrique ^{1, 2, 3, 4, 5} , Bassin méditerranéen ^{6, 7, 8} , Asie ^{9, 10, 11, 12}
<i>C. brevitarsis</i>	Asie ¹³ , Australie ¹⁴
<i>C. bolitinos</i>	Afrique du Sud ^{15, 16}
<i>C. obsoletus</i>	Bassin méditerranéen ^{17, 18}
<i>C. scoticus</i>	Bassin méditerranéen ¹⁹
<i>C. dewulfi</i>	Europe du Nord ²⁰
<i>C. fulvus</i>	Australie ¹⁴ , Asie ^{13, 21, 22}
<i>C. dumdumi</i>	Asie, Australie ²³
<i>C. orientalis</i>	Asie ^{13, 21, 22}
<i>C. actoni</i>	Australie, Asie ²⁴
<i>C. pusillus</i>	Amérique centrale ^{25, 26} , Amérique du Sud ²⁵
<i>C. wadai</i>	Asie ^{13, 21} , Australie ²⁷
<i>C. brevipalpis</i>	Asie ²⁸ , Australie ²⁸
<i>C. gulbenkiani</i>	Afrique du Sud ²³
<i>C. tororoensis</i>	Afrique ³
<i>C. pulicaris</i>	Europe ²⁹
<i>C. magnus</i>	Afrique ²³
<i>C. sonorensis</i>	Amérique Centrale ³² , Amérique du Nord ^{30, 31} , Amérique du Sud ³²
<i>C. nubeculosus</i>	Europe de l'Est ³³
<i>C. puncticollis</i>	Afrique ²³
<i>C. oxystoma</i>	Chine ²⁸
<i>C. nevillei</i>	Afrique ²³
<i>C. insignis</i>	Amérique du Sud ^{25, 34} , Amérique centrale ²⁶ , Caraïbes ^{25, 26}
<i>C. filarifer</i>	Amérique Centrale ²⁶ , Australie ¹⁴
<i>C. peregrinus</i>	Afrique ²³
<i>C. milnei</i>	Amérique du Nord ^{3, 35}
<i>C. stellifer</i>	Amérique du Nord ³⁶
<i>C. furens</i>	Afrique ³⁷
<i>C. pycnostictus</i>	Amérique du Nord ³⁸
<i>C. trilineatus</i>	Amérique Centrale ³⁸
<i>C. homotomus</i>	Asie ²⁸
<i>C. cornutus</i>	Afrique ³⁹
<i>C. boydi</i>	Amérique du Nord ²⁸

Tableau 3 - Liste des 33 espèces du genre *Culicoides* impliquées dans la transmission de la FCO.

Adapté de ¹Meiswinkel *et al.*, 1994 ; ²Blackburn *et al.*, 1985 ; ³Walker & Davies, 1971 ; ⁴Mellor *et al.*, 1984 ; ⁵Nevill *et al.*, 1992 ; ⁶Mellor *et al.*, 1985 ; ⁷Mellor *et al.*, 1990 ; ⁸Boorman, 1986 ; ⁹Boorman, 1989 ; ¹⁰Braverman *et al.*, 1976 ; ¹¹Jennings *et al.*, 1983 ; ¹²Muller & Li, 1996 ; ¹³Sukarsih *et al.*, 1993 ; ¹⁴Standfast *et al.*, 1985 ; ¹⁵Venter *et al.*, 1998 ; ¹⁶Venter & Meiswinkel, 1994 ; ¹⁷Mellor & Pitzolis, 1979 ; ¹⁸De Liberato *et al.*, 2005 ; ¹⁹Savini *et al.*, 2005 ; ²⁰OIE, 2006 ; ²¹Sukarsih *et al.*, 1996 ; ²²Sendow *et al.*, 1996 ; ²³Meiswinkel *et al.*, 2004 ; ²⁴Zhang *et al.*, 1999 ; ²⁵Greiner *et al.*, 1985 ; ²⁶Mo *et al.*, 1994 ; ²⁷Mellor, 1998 ; ²⁸FAO ; ²⁹Caracappa *et al.*, 2003 ; ³⁰Tabachnick, 1992 ; ³¹Tabachnick & Holbrook, 1992 ; ³²Mellor *et al.*, 2000 ; ³³Mellor & Leake, 2000 ; ³⁴Kramer *et al.*, 1985 ; ³⁵Wieser-Schimpf *et al.*, 1993 ; ³⁶Mullen & Anderson, 1998 ; ³⁷Paweska *et al.*, 2002 ; ³⁸Greiner *et al.*, 1990 ; ³⁹Venter *et al.*, 1994.

6 - Contrôle de la maladie

La propagation de la maladie peut se faire soit par le biais de déplacements d'animaux infectés et/ou de leurs semences et embryons, soit par le transport du vecteur infecté et infectant. Le contrôle de la maladie peut s'effectuer de plusieurs façons ; par la mise en place de réseaux d'épidémio-surveillance permettant le contrôle des mouvements d'animaux et le suivi des populations d'insectes vecteurs d'une part et par la lutte anti-vectorielle ou anti-virale d'autre part. Les stratégies de lutte seront également différentes selon le statut endémique ou épidémique de la zone infectée. En effet, dans ce dernier cas, une éradication de la maladie est tentée alors que dans les régions d'endémies, seule une limitation de la propagation est envisagée.

La surveillance épidémiologique est « une méthode d'observation fondée sur des enregistrements en continu permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier de déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures appropriées de lutte » (Toma *et al.*, 1991).

6-1 - Réseaux d'épidémio-surveillance

Dans le cas de maladies vectorielles, il est essentiel de mettre en place une surveillance entomologique afin d'estimer la distribution et la dynamique des vecteurs. Dans le cas idéal, la recherche du pathogène dans le vecteur peut permettre de compléter efficacement le dispositif. A cette surveillance entomologique est jointe la surveillance virologique plus classique.

6-1-1 - Surveillance entomologique

La surveillance entomologique est essentielle pour comprendre et prédire la progression de la maladie. Les objectifs de la surveillance entomologique dans le cas de la FCO visent à (i) réaliser un inventaire des espèces de *Culicoides* inféodés aux élevages dans une région dont les espèces susceptibles de transmettre le virus et (ii) étudier la dynamique saisonnière de ces espèces de *Culicoides* afin de préciser leurs périodes d'activité et d'inactivité. Les données peuvent être interprétées avec les outils

de la télédétection (images satellitaires) et les logiciels d'analyse spatiale (systèmes d'informations géographiques ou SIG) (Baldet *et al.*, 2003 ; Guis *et al.*, 2007). Ainsi, lors de l'épizootie d'octobre 2000 en Corse un réseau de surveillance entomologique a rapidement été mis en place afin de faire un suivi de la dynamique des populations de vecteurs en Corse (Delécolle & de La Rocque, 2002) mais aussi pour détecter toute introduction du vecteur *C. imicola* sur le continent français (Baldet *et al.*, 2003). Si aucune preuve de la présence de *C. imicola* n'a été établie en 2002 sur le continent, 2 spécimens y ont été récoltés en mai et septembre 2003. L'installation d'une population a été confirmée dès le mois d'octobre 2004 et semble depuis stabilisée. En été/automne 2006, des foyers cliniques de FCO ont été détectés en Belgique, aux Pays Bas, dans l'ouest de l'Allemagne et dans le Nord-Est de la France dans les départements du Nord (59), des Ardennes (08) et de la Meuse (55). Des enquêtes entomologiques ont montré l'absence du vecteur avéré de la FCO en méditerranée, *C. imicola* et l'implication d'espèces locales de *Culicoides* dans la transmission du virus (Baldet *et al.*, 2007).

6-1-2 - Surveillance virologique

En cas de suspicion clinique ou sérologique de FCO, une mise sous surveillance sanitaire de l'exploitation est alors engagée. Ceci impose, la mise en quarantaine de l'exploitation, avec interdiction des mouvements d'animaux et de produits génétiques (semences...), et la mise en œuvre de mesures préventives est alors appliquée. De plus, des prélèvements sanguins sont effectués sur 30 animaux du cheptel suspect, afin de confirmer le diagnostic. Enfin, la mise en évidence d'un foyer (animal provenant d'un cheptel infecté) entraîne l'instauration, d'un périmètre interdit, d'un rayon d'au moins 20 km autour de ce foyer, et la mise en place d'une zone de protection de 100 km incluant le périmètre interdit et une zone d'observation de 50 km autour de la zone de protection. Dans chaque zone, des mesures de surveillance et de contrôle des mouvements d'animaux sont imposées.

6-2 - Lutte anti-vectorielle

La propagation de la maladie est essentiellement due à l'abondance et aux mouvements actifs et passifs (par le vent) des *Culicoides* adultes et secondairement, aux déplacements des ruminants infectés et transportés. La lutte anti-vectorielle apparaît difficile voire impossible du fait de cette dispersion et du grand nombre de gîtes larvaires (Meiswinkel *et al.*, 1994). Cette lutte peut être dirigée contre les larves ou contre les imagos.

6-2-1 - Lutte anti-larves

La destruction des larves s'avère d'autant plus difficile que les gîtes larvaires sont encore mal définis pour un certain nombre d'espèces, notamment pour les espèces du genre *Avaritia* et particulièrement pour *C. imicola*. En effet, les gîtes larvaires sont très difficilement identifiables en dépit du grand nombre d'adultes piégés sur un même site (Delécolle, communication personnelle).

La lutte biologique, qui consiste en l'élimination des larves par l'utilisation, de virus entomopathogènes tels que les *Baculovirus*, *Reovirus* ou *Entomopoxvirus* (Purrini *et al.*, 1988), de bactéries dont la plus couramment utilisé est *Bacillus thuringiensis* (Ahmed *et al.*, 1994) ou de nématodes, est très peu utilisée chez les *Culicoides* car aucun ennemi des larves n'est assez efficace pour les éliminer en totalité (Holbrook, 1985).

La lutte mécanique qui consiste à drainer et à assécher les points d'eau, permet d'en éliminer certains mais cette technique est difficilement envisageable sur des points d'eau souvent inaccessibles, ou sur des biotopes particuliers (fumiers,...).

Dans certaines conditions, il est possible de réduire les populations d'adultes en traitant les gîtes larvaires avec des produits chimiques tels que le Téméphos (Holbrook, 1985).

6-2-2 - Lutte anti-adultes

Les pyréthrinoides sont efficaces contre tous les insectes. Malheureusement, l'efficacité globale des insecticides à base de pyréthrinoides (perméthrine, pirimiphos-méthyle, deltaméthrine) demeure limitée sur les *Culicoides* (Mullens *et al.*, 2000 ; 2001). Des travaux récents ont montré qu'un traitement à base d'un antihelminthique, la doramectine dérivé de la famille de composés de l'ivermectine, protégeait les moutons contre une infection au virus de la FCO (Sollai *et al.*, 2007). Cet agent antiparasitaire agit en tant que répulsif et réduirait considérablement les piqûres dues aux *Culicoides*.

Devant le peu de moyens de lutte efficaces à disposition contre le vecteur, d'autres mesures préventives doivent être prises tel que le confinement dans les bâtiments d'élevage des troupeaux aux heures où les *Culicoides* prennent leur repas de sang.

6-3 - Lutte contre l'agent pathogène

La vaccination est le meilleur moyen de lutte disponible contre la FCO, particulièrement en cas d'épizootie provoquée par un sérotype unique. Après une infection naturelle, l'hôte développe une immunité forte et durable contre le sérotype homologue mais pas contre des sérotypes hétérologues. Il en est de même avec les vaccins à virus atténué ou inactivé, utilisés en routine sur le terrain. Cependant, dans les zones d'endémies, il est fréquent de rencontrer plusieurs sérotypes à la fois, ceci imposant donc l'utilisation de vaccins multivalents.

6-3-1 - Les vaccins à virus atténué

Les vaccins à virus atténué sont produits à partir de souches spontanément avirulentes ou à partir de souches virulentes atténuées par passages successifs en culture cellulaire ou sur œufs embryonnés (Eloit, 1998).

Les vaccins à virus atténué contre la FCO, sont produits par un nombre limité de laboratoires : en Afrique du Sud (OBP - Onderstepoort Biological Products), en Italie (IZS - Istituto Zooprofilattico Sperimentale), au Maroc (Biopharma). Ce sont les vaccins les plus utilisés actuellement en routine pour lutter contre la maladie. Ils sont

employés depuis plus de 50 ans en Afrique du Sud et ont prouvé leur efficacité. Ce type de vaccins est facile à produire, peu coûteux, administrable en une seule injection et induit une réponse immunitaire forte de longue durée. Cependant, ils sont spécifiques d'un sérotype donné et protègent donc uniquement contre des infections homologues. Dans les zones où plusieurs sérotypes sévissent en même temps, l'utilisation de vaccins multivalents est nécessaire. Ils peuvent être utilisés sous forme monovalente jusqu'à pentavalente. Ces vaccins atténués sont utilisés chez les ovins, les bovins et les caprins. Malgré leur efficacité, certains inconvénients liés à leur utilisation ont été rapportés:

- Des effets secondaires dus à la vaccination ont été rapportés chez des ovins, notamment de la fièvre, des oedèmes de la face et des boiteries (Savini *et al.*, 2007a), ainsi qu'une baisse de la production de lait (Savini *et al.*, 2004 ; Monaco *et al.*, 2004).
- Des effets tératogènes sur le développement fœtal ont été observés chez des femelles gestantes (MacLachlan *et al.*, 1985 ; Murray & Eaton, 1996).
- Possibilité de transmission de ces vaccins par les vecteurs *Culicoides* (Venter *et al.*, 2004 ; Ferrari *et al.*, 2005).
- Une recombinaison entre les souches sauvages et les souches vaccinales est également possible ceci pouvant générer un nouveau variant viral.
- Une atténuation insuffisante entraînant des signes cliniques résiduels comme ce qui a été observé en Corse et dans le reste de l'Europe avec le vaccin à virus atténué de sérotype 16 (Savini *et al.*, 2007a).
- Une réversion de virulence est également envisageable.
- Une protection incomplète des animaux peut être observée lors de l'utilisation de vaccins multivalents (Verwoerd & Erasmus, 1994).
- Ils ne permettent pas de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.

6-3-2 - Les vaccins à virus inactivé

Les vaccins à virus inactivé représentent une alternative aux vaccins à virus atténué. Ils sont obtenus par exposition de l'agent pathogène à un agent physique (chaleur, UV) ou chimique (formol, bétapropioloactone, éthylèneimine) ce qui entraîne

une perte totale d'infectivité sans dénaturer le pouvoir immunogène (Parker *et al.*, 1975 ; Stott *et al.*, 1979 ; Campbell, 1985 ; Stevens *et al.*, 1985 ; Stott *et al.*, 1985). Ce type de vaccins offre un certain nombre d'avantages par rapport aux vaccins à virus atténué, notamment l'impossibilité de répllication du virus, de transmission aux vecteurs donc de réassortiments entre les souches et de réversion de virulence. De plus, les vaccins à virus inactivé ne provoquent pas d'effets tératogènes.

Des essais sur le terrain ont prouvé la grande efficacité de ce type de vaccins (Stott *et al.*, 1985 ; Di Emidio *et al.*, 2004). Cependant, même si beaucoup de tentatives ont été menées ces dernières années pour développer des vaccins à virus inactivés, seuls Merial et l'IZS sont parvenus pour l'instant à commercialiser ce type de produit pour lutter contre les sérotypes 2, 4 et 16 (Savini *et al.*, 2007b). Les deux vaccins monovalents (sérotipe 2 et sérotipe 16), ainsi qu'un bivalent 2 et 4, ont été utilisés pour certains d'entre eux en Corse, en Espagne, au Portugal, et en Italie (Savini *et al.*, 2007a). Ce type de vaccins est plus coûteux à la production que les vaccins à virus atténué et nécessite jusqu'à présent, une dose de rappel trois à quatre semaines après la première injection. De manière à obtenir une réponse immune satisfaisante, ces vaccins doivent contenir une quantité importante d'agents pathogènes et nécessitent la présence d'adjuvants, deux facteurs qui expliquent leur coût de production élevé (Eloit, 1998). Ce type de vaccins ouvre la possibilité de développer une stratégie DIVA (Differentiation between Infected and Vaccinated Animals). En effet, lors des processus de purification des particules virales, les protéines non structurales sont éliminées. Le développement d'un outil diagnostic basé sur une des protéines non structurales permettrait de différencier les animaux vaccinés des animaux infectés.

6-3-3 - Les vaccins dits de « nouvelle génération »

Les techniques de biologie moléculaire n'ont pas seulement permis d'identifier certains gènes de virulence ; elles ont aussi conduit à identifier les protéines majeures contre lesquelles la réponse immune de l'hôte est dirigée. Le gène ou une partie de celui-ci peuvent alors être clonés dans un vecteur (bactérie, virus).

Le système baculovirus est très utilisé pour la production de structures protéiques similaires aux particules virales mais sans contenir de matériel génétique (French & Roy, 1990 ; French *et al.*, 1990): il s'agit de structures protéines reconstituant le core (core-like particles, CLPs) ou reconstituant le virus (viral-like particles VLPs).

Les réponses immunitaires contre ces protéines synthétiques ont été évaluées *in vitro* et au cours d'expérimentations animales (Roy, 1991 ; 1992b ; 1993 ; 1995 ; Roy et Erasmus, 1992 ; Roy *et al.*, 1990b ; 1992 ; 1994a ; 1994b ; Urakawa *et al.*, 1994 ; Johnson et Roy, 1996). Des vaccins utilisant des antigènes composés de pseudo-particules constituées de protéines de structure VP2-VP5 du virus de la FCO ont donné des résultats prometteurs en procurant une protection totale contre un challenge homologue mais n'ont jamais été commercialisés (Roy *et al.*, 1990b). Ce type de vaccin reste toutefois spécifique d'un sérotype donné.

Le système des vaccins recombinants a également été très largement testé mais reste à l'état de recherche et n'est pas commercialisé. Ainsi Boone *et al.*, 2007 et Lobato *et al.*, 1997 ont obtenu une protection, après une épreuve homologue, des moutons immunisés respectivement avec un vaccin canarypoxvirus ou vaccine, co-exprimant les protéines de la capside externe, VP2 et VP5. Toutefois, il est probable que ce type de vaccin ne confère qu'une protection spécifique du sérotype. Wade-Evans *et al.*, 1996 ont produit un capripoxvirus exprimant la protéine majeure de la capside interne, VP7. Ce recombinant exprimant une protéine conservée du virus a conféré une protection contre le sérotype homologue et un certain degré de protection contre un sérotype hétérologue.

Les vaccins de « nouvelle génération » (VLPs, CLPs ou recombinants) ouvrent la possibilité de développer des vaccins marqués ou DIVA. En revanche, seuls des vaccins basés sur les protéines conservées entre sérotypes permettraient une protection contre plusieurs sérotypes.

Chapitre 2 - Les poxvirus

La famille des *Poxviridae* regroupe un ensemble de virus à ADN largement répandus dans le monde animal, certains d'entre eux sont pathogènes pour l'homme. Les poxvirus diffèrent de la plupart des autres virus par leur grande taille, la complexité de leur structure, leur multiplication intra cytoplasmique et leur très grande résistance dans le milieu extérieur. Le développement récent du virus de la vaccine comme vecteur d'expression de gènes étrangers a permis une avancée considérable dans le domaine de la vaccination.

1 - Historique

L'histoire des *Poxvirus* est marquée par l'histoire de la variole. Les premières descriptions connues de la variole, ou « smallpox virus », remontent au 4^{ème} siècle après Jésus-Christ en Chine. La maladie fut importée en Occident au début du 16^{ème} siècle. Vers la fin du 18^{ème} siècle en Europe, environ 400 000 personnes mouraient chaque année de la variole. Elle est ainsi devenue au 18^{ème} et 19^{ème} siècle la plus redoutée de toutes les maladies.

La lutte contre la variole retiendra trois grandes périodes : celle de la variolisation, celle de la vaccination puis celle de la campagne mondiale d'éradication, lancée en 1967 et achevée en 1980 (Lombard *et al.*, 2007).

La pratique de la variolisation, remontant à la Chine ancienne, consistait à inoculer une forme que l'on espérait peu virulente de la variole par mise en contact de la personne à protéger avec la substance issue des vésicules d'un malade. Le résultat restait cependant aléatoire et risqué, le taux de mortalité pouvant atteindre 1 à 2%.

La découverte de la vaccination est généralement attribuée à Edward Jenner, médecin anglais, qui découvrit en 1796, que la vaccine (*Vacca*, vache en latin) engendrait chez l'homme une protection contre la variole humaine. Le 14 mai 1796, E. Jenner inocula à un enfant du pus prélevé sur la main d'une fermière infectée par le virus de la vaccine. Trois mois plus tard, il inocula la variole à l'enfant qui se révéla protégé contre la maladie. Il nomma ce procédé vaccination. Trois quarts de siècle plus tard, Louis Pasteur prit pour point de départ les travaux de E. Jenner pour établir le

principe des vaccinations préventives et étendit ce terme à l'induction de la protection contre d'autres agents infectieux.

En 1967, débute une campagne visant à éradiquer la variole. Au cours de la première année du Programme Intensif d'Eradication de la variole, on dénombrait 131789 cas de variole dans 44 pays dont 31 dans lesquels la maladie sévissait de façon endémique (le Brésil, la plupart des pays d'Afrique sub-saharienne, l'Inde, l'Indonésie, le Népal et le Pakistan). La transmission de la maladie fut stoppée en Ethiopie en 1976, et en Somalie le 26 octobre 1977, date du dernier cas de variole naturelle. Le 29 octobre 1979, l'OMS déclara la variole éradiquée de la surface de la terre. La vaccination fut arrêtée le 8 mai 1980 (Stewart & Devlin, 2006).

2 - Classification

La famille des *Poxviridae* est organisée en deux sous-familles, les *Chordopoxvirinae* infectant les vertébrés (Fauquet *et al.*, 2005) et les *Entomopoxvirinae* infectant les invertébrés. Les *Chordopoxvirinae* sont organisés en 8 genres (Buller & Palumbo, 1991) référencés dans le tableau 4 ci-dessous.

Genre	Virus types	Réservoirs
<i>Orthopoxvirus</i>	Virus de la variole bovine (cowpox)	Bovins, Félines, Humains, Rongeurs
	Virus Ectromélie	Rongeurs
	Virus de la variole du chameau (camelpox)	Camélidés
	Virus de la variole humaine (smallpox)	Humains
	Virus de la vaccine*	Réservoir très large
<i>Capripoxvirus</i>	Virus de la variole ovine (sheeppox)	Ovins
	Virus de la variole caprine (goatpox)	Caprins
	Virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Lumpy skin disease virus)	Bovins
<i>Parapoxvirus</i>	Virus de l'ecthyma contagieux (Orf)	Ovins, Caprins
	Virus de la paravaccine (pseudocowpox)	Bovins, Humains
<i>Avipoxvirus</i>	Virus de la variole aviaire (canarypox, fowlpox)	Oiseaux
<i>Leporipoxvirus</i>	Virus de la myxomatose du lapin	Lapins
<i>Suipoxvirus</i>	Virus de la variole porcine	Porcins
<i>Molluscipoxvirus</i>	Virus Molluscum contagiosum	Humains
<i>Yatapoxvirus</i>	Virus de la tumeur Yaba du singe	Singes, et parfois Humains
	Virus Tana	

Tableau 4 - Classification de la sous-famille des *Chordopoxvirinae*. Adapté de Bertagnoli, 2003, * Réservoir d'hôtes extrêmement large d'où son utilisation massive en tant que vecteur vaccinal (Pastoret *et al.*, 1996).

Les membres d'un même genre sont caractérisés par une morphologie et des propriétés biologiques identiques (Moss, 1996). Les membres du genre *Orthopoxvirus* et en particulier le virus de vaccine, sont les virus les plus étudiés parmi la famille des *Poxviridae*.

3 - Epidémiologie et répartition géographique

Pour cette partie, nous avons choisi de ne traiter que les *Orthopoxvirus* et les *Capripoxvirus*.

3-1 - Les *Orthopoxvirus*

Nous allons nous intéresser dans ce paragraphe à quatre virus types appartenant au genre *Orthopoxvirus* : le virus de la variole bovine, le virus Ectromélie, le virus de la vaccine et le virus de la variole humaine.

Le virus de la variole bovine ou cowpoxvirus a été nommé ainsi en raison de son association avec les lésions observées sur les pis des vaches et sur la main des trayeurs (Downie, 1939) ; pourtant, les bovins ne sont pas le réservoir naturel de ce virus (Baxby, 1977). Le virus de la variole bovine est retrouvé essentiellement en Europe de l'Ouest et possède un spectre d'hôte extrêmement large. Il infecte, entre autres, les rongeurs, qui sont des hôtes préférentiels (Ladnyi *et al.*, 1975), les félins et les éléphants (Marennikova *et al.*, 1978).

Le virus Ectromélie a été isolé pour la première fois par Marchal sur une souris de laboratoire (Marchal, 1930). Ce virus est relativement commun dans les colonies de souris de laboratoire en Europe et Asie mais infecte seulement certaines espèces (Buller *et al.*, 1986).

Le virus de la vaccine (vaccinia virus) a été utilisé lors du programme mondial d'éradication de la variole humaine. Cependant, l'origine du virus de la vaccine reste mystérieuse et plusieurs hypothèses ont été avancées. Il a été notamment proposé que le virus de la vaccine dériverait soit d'une souche du virus de la variole après plusieurs passages sur la peau de bovins ou d'humains soit d'un capripoxvirus après des passages répétés sur la peau d'animaux (Baxby, 1981). Une autre hypothèse suggère qu'il s'agirait d'un hybride entre un capripoxvirus et le virus de la variole (Bedson &

Dumbell, 1964). Dans les conditions expérimentales, le virus de la vaccine présente un large spectre d'hôte dont l'homme.

Le virus de la variole humaine (smallpox) était, avant son éradication complète, retrouvé de manière endémique sur tous les continents excepté en Australie et dans certaines îles (Buller & Palumbo, 1991). En raison de son spectre d'hôte très limité et de l'absence de réservoir animal, le programme d'éradication de la maladie fut un succès. Le dernier cas de variole humaine rapporté a été signalé en Somalie en 1977 (Fenner *et al.*, 1988).

3-2 - Les *Capripoxvirus*

Le genre *Capripoxvirus*, comprend trois virus affectant les ruminants ; le virus de la clavelée du mouton, le virus de la variole caprine et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse.

La clavelée du mouton ou variole ovine (sheeppox) est signalée depuis le premier siècle après Jésus Christ. Depuis, de nombreuses épizooties, ont été rapportées en Europe et dans le bassin méditerranéen. La première description de la variole caprine (goatpox) a été faite en 1879, en Norvège, par Hansen. Tout comme la clavelée du mouton, la variole caprine a été signalée depuis sur les pays du pourtour méditerranéen (Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003). Actuellement, on retrouve ces deux maladies en Afrique du Nord, Afrique subsaharienne, Asie et Moyen Orient (figure 8). Dans les conditions naturelles, les virus de la clavelée et de la variole caprine sont pathogènes principalement pour l'espèce ovine et l'espèce caprine respectivement.

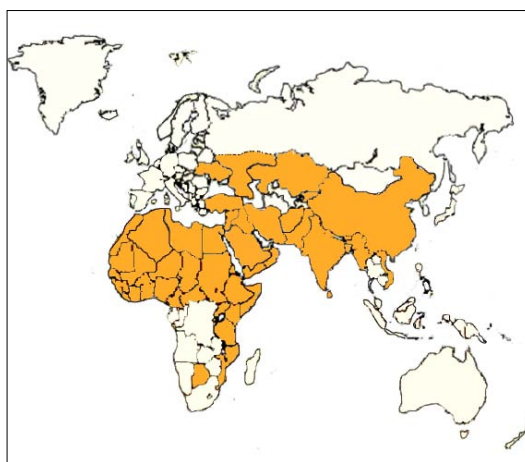


Figure 8 - Répartition géographique de la clavelée du mouton et de la variole caprine. Adapté de Fassi-Fehri & Lefèvre, 2003.

Le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou Lumpy skin disease virus est décrit pour la première fois par McDonald en 1929 en Zambie. La maladie est cantonnée à l'Afrique australe jusqu'en 1950 puis elle gagne l'Afrique de l'Est et Madagascar. Depuis les années 1970, la maladie est enzootique sur le continent africain jusqu'au Sud du Sahara ainsi qu'au Moyen Orient (figure 9) (Lefèvre & Gourreau, 2003). Seuls les bovins et les zébus présentent des signes cliniques de la maladie. Cependant, le premier cas de dermatose nodulaire signalé au Kenya a été observé sur des ovins (Davies, 1976), la souche ainsi isolée (KS-1 pour Kenya sheep-1) a été rapprochée, par la suite, au virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Kitching *et al.*, 1986 ; Tulman *et al.*, 2001 ; Le Goff *et al.*, 2005). La maladie n'a jamais été signalée chez des animaux sauvages.

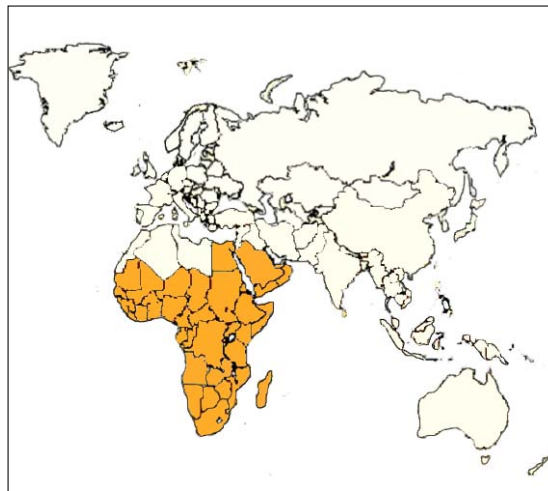


Figure 9 - Répartition géographique de la dermatose nodulaire contagieuse. Adapté de Lefèvre & Gourreau, 2003.

4 - Etiologie

Les poxvirus sont parmi les plus gros et les plus complexes des virus animaux.

4-1 - Structure

Les virions, de forme ovoïde, ont une taille comprise entre 200 et 400 nm (figure 10). Ces derniers sont organisés en un core central biconcave, ou nucléosome, contenant

le génome, et de deux corps latéraux. L'enveloppe externe est d'origine virale et ne dérive pas de la membrane de la cellule infectée.

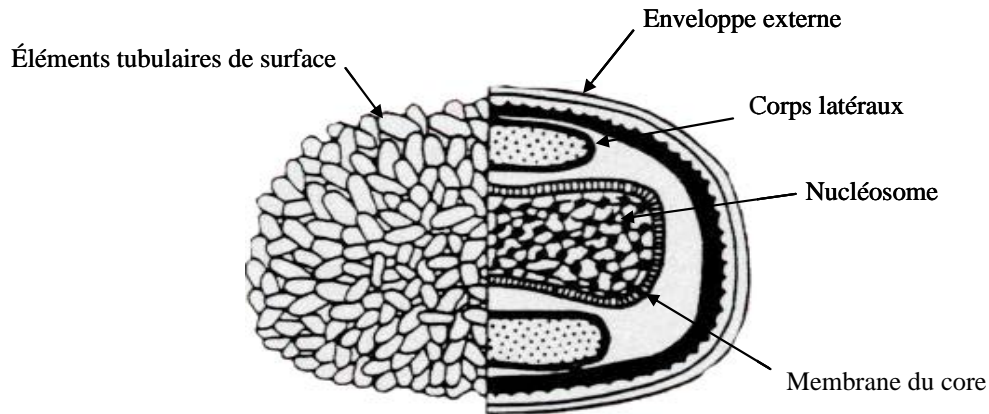


Figure 10 - Représentation schématique de la structure d'un *Poxvirus*. Adapté de Bertagnoli, 2003.

Le génome des *Poxviridae*, est composé d'un ADN double brin linéaire, d'une taille comprise entre 130 et 375 kpb (Moss, 1992). La partie essentielle du génome est située en région centrale, fortement conservée au sein du genre et est composée de gènes intervenant dans la réplication du virus ainsi que dans la synthèse des protéines de structure. Les régions situées aux extrémités sont composées de gènes non essentiels à la réplication mais pouvant être impliqués notamment dans la virulence. Le génome est associé à une ADN polymérase virale. Le séquençage du virus de la variole ou de la vaccine a permis de dénombrer environ 200 gènes (Goebel *et al.*, 1990).

4-2 - Cycle viral

Fait unique chez les virus à ADN, la réplication des poxvirus se déroule dans son intégralité dans le cytoplasme des cellules qu'ils infectent (Moss, 1996) et sa durée varie selon la nature du virus et l'origine de la cellule. La quasi-totalité des données concernant le cycle de réplication proviennent de celles obtenues à partir du virus de la vaccine (Buller & Palumbo, 1991). Le cycle viral des *Orthopoxvirus* se décompose en 9 phases principales (figure 11).

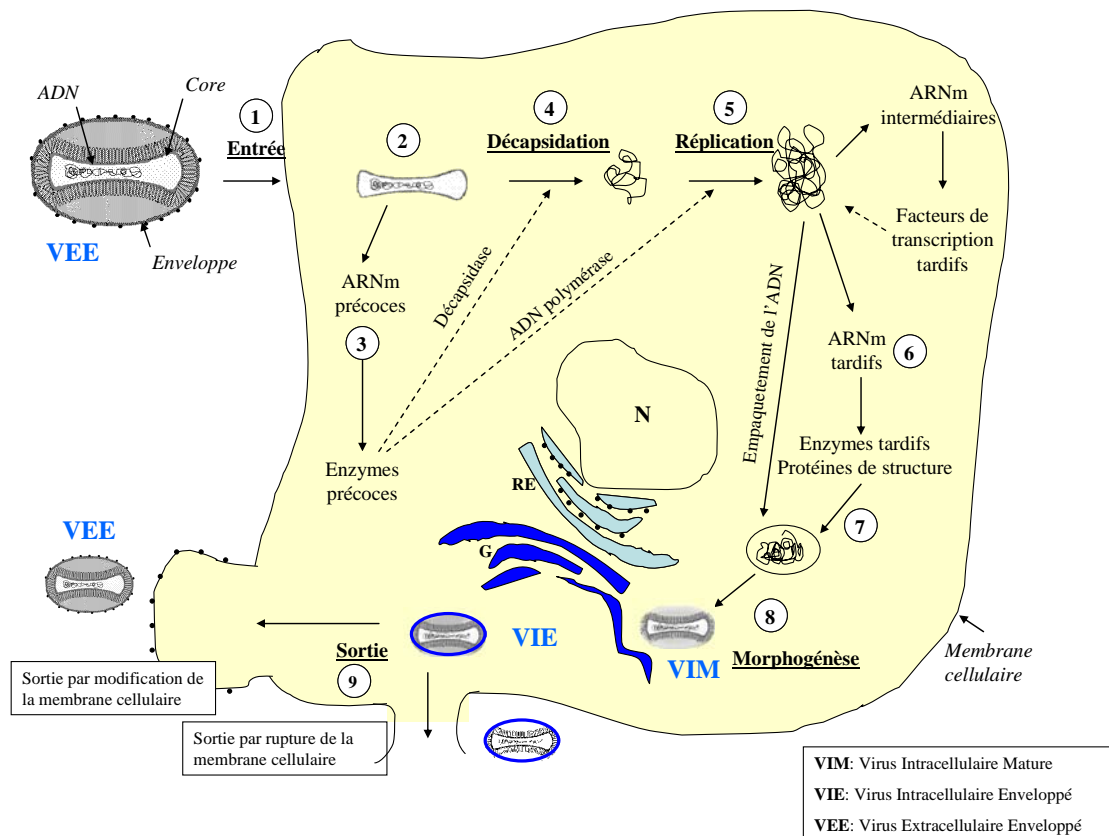


Figure 11 - Représentation schématique du cycle de réplication des *Orthopoxvirus*. Adapté de Moss, 1991.

Après liaison du virus à la membrane de la cellule cible, le virus entre dans celle-ci par endopinocytose (1). Sous l'effet d'enzymes du lysosome cellulaire, le virus subit une première décapsidation qui met à nu le core (2). Une partie de l'ADN viral est transcrit en ARN messagers précoces (3) par une transcriptase d'origine virale ; ces ARNm sont traduits en enzymes précoces dont une décapsidase virale et une ADN polymérase. Sous l'effet de cette décapsidase, une deuxième décapsidation a lieu et l'ADN viral est totalement libéré (4). L'ADN viral se réplique alors dans le cytoplasme à l'aide de la polymérase (5). La synthèse des protéines de la cellule hôte est rapidement et efficacement inhibée au profit de la genèse des virions. Les gènes intermédiaires et tardifs sont ensuite exprimés (6) aboutissant à la synthèse des protéines de structure (7). La morphogénèse des virions se déroule à proximité du noyau de la cellule (8) aboutissant à une première forme infectieuse de Virus Intracellulaire Mature (VIM). Les VIM sont ensuite enveloppés par une membrane issue de l'appareil de Golgi (G) et s'arrangent en une nouvelle forme de virion appelée, Virus Intracellulaire Enveloppé (VIE). La sortie du virus de la cellule peut s'effectuer de deux manières (9) ; soit par rupture de la membrane cellulaire soit par fusion du virus avec la membrane cellulaire et sortie sous une forme de Virus Extracellulaire Enveloppé (VEE).

5 - La maladie

5-1 - Symptômes

Les symptômes associés aux poxviroses sont globalement identiques quel que soit l'agent pathogène considéré. On peut ainsi distinguer deux formes de pathologie, une forme classique vésiculeuse et une forme compliquée.

La forme classique se décompose en 4 phases, la phase d'invasion, la phase d'éruption, la phase de sécrétion et la phase de dessiccation. Lors de la première phase, dont la durée est variable suivant le pathogène, les hôtes manifestent de l'hyperthermie, de l'abattement, une perte d'appétit et des sécrétions lacrymales, salivaires et nasales. Au cours de la phase d'éruption, des taches roses ou rouges apparaissent, s'étendent rapidement et se transforment en papules de diamètre variable. L'éruption peut se généraliser à tout le corps. Au cours de cette phase, la température de l'hôte redevient normale. Lors de la phase de sécrétion, les papules se transforment en vésicules (figure 12 et 13). Finalement, la dernière phase de la maladie se traduit par une dessiccation des papules et la formation de croûtes. Ces dernières se détachent et font place à des processus cicatriciels laissant des traces indélébiles.

Dans les formes compliquées, des difficultés respiratoires profondes, des jetages abondants et sanguinolents ainsi que des troubles digestifs peuvent apparaître.



Figure 12 - Symptômes observés chez un bovin atteint de dermatose nodulaire contagieuse. Photo G. Gari, NAHRC, Sebata, Ethiopie.



Figure 13 - Lésions papulo-vésiculeuses chez une chèvre atteinte de variole caprine. Photo J. Chantal.

5-2 - Diagnostic

Concernant les pathologies d'importance vétérinaire (variole caprine, clavelée du mouton, dermatose nodulaire contagieuse...), le diagnostic clinique repose sur l'observation d'hyperthermie associée à des éruptions cutanées papuleuses, pustuleuses ou nodulaires. Le diagnostic de laboratoire repose, en premier lieu, sur un isolement puis amplification de la souche isolée en culture cellulaire à partir des nodules cutanés prélevés sur l'hôte. Les techniques de PCR permettent désormais de différencier les Parapoxvirus (virus Orf) des Capripoxvirus (variole ovine/ caprine, dermatose nodulaire) aux symptômes cliniques très proches (Inoshima *et al.*, 2000 ; Zheng *et al.*, 2007). Le diagnostic sérologique repose sur un dépistage des anticorps par immunofluorescence, immunodiffusion sur gel ou ELISA (Heine *et al.*, 1999 ; Bertagnoli, 2003b ; Gourreau, 2003 ; Lefèvre & Gourreau, 2003). Même si elle est de moins en moins utilisée, la microscopie électronique représente également une technique efficace.

5-3 - Prophylaxie

La lutte contre les poxviroses d'importance vétérinaire se fait au travers d'une prophylaxie sanitaire dans les pays indemnes et par vaccination dans les pays infectés.

Des vaccins à virus vivants atténués sont disponibles pour toutes les poxviroses d'importance vétérinaire, induisant tous une immunité solide et de longue durée. Dans le cas des Capripoxvirus, des vaccins recombinants ont été mis au point en utilisant ce dernier comme vecteur d'expression de transgènes. Dans le cas de la dermatose nodulaire contagieuse, deux souches sont couramment utilisées dans des campagnes de vaccination, la souche Neethling (origine Afrique du Sud) et la souche KS-1 (origine Afrique de l'Ouest). Cette dernière est thermorésistante, son pouvoir de diffusion est très limité et son pouvoir pathogène résiduel se caractérise par des lésions nodulaires disparaissant en quelques jours chez la chèvre et le mouton. En revanche, cette souche peut montrer des effets indésirables chez certaines races sensibles de bovins (Yeruham *et al.*, 1994). Toutefois, cette même souche recombinée avec un antigène de la peste bovine n'a induit que des papules au point d'injection se résorbant rapidement chez les bovins (Romero *et al.*, 1993).

6 - Utilisation des poxvirus en tant que vecteurs vaccinaux

6-1 - Propriétés

De nombreux virus animaux ont été utilisés comme vecteurs d'expression de gènes hétérologues (Rigby, 1983). Ainsi, les papillomavirus bovins (Sarver *et al.*, 1981), les adénovirus (Solnick, 1981 ; Thummel *et al.*, 1981), et certains membres de la famille des rétrovirus (Shimotohno & Temin, 1981 ; Wei *et al.*, 1981), ont été très largement utilisés comme vecteurs d'expression. Cependant, la relative petite taille du génome de ces virus, facilite leur manipulation mais s'avère être une contrainte importante pour les quantités d'ADN à intégrer au sein de leur génome. De plus, ces virus ont généralement une spécificité d'hôte étroite et ils requièrent des lignées cellulaires spécifiques pour leur réplication.

Sa grande taille, et sa spécificité d'hôte étendue ont fait du virus de la vaccine et des poxvirus en général des vecteurs d'expression de choix. De nombreuses souches ont été utilisées en tant que vaccins à virus atténué en raison de leur grande efficacité et de l'immunité protectrice obtenue sur le long terme après seulement une seule injection. Le virus de la vaccine a été le premier poxvirus à être employé comme vecteur vaccinal, il y a une vingtaine d'années. Il a été utilisé notamment pour exprimer les antigènes de

surface du virus de l'herpes simplex ou le gène de l'hémagglutinine du virus influenza (Paoletti *et al.*, 1984 ; Smith *et al.*, 1984 ; Mackett *et al.*, 1985 ; Mackett & Smith, 1986). Cependant, l'utilisation de souches répliquatives de ce virus s'est avérée limitée. Le virus de la vaccine a une très large spécificité d'hôte et est ainsi capable d'infecter de nombreuses espèces animales, en plus de celles ciblées pour la vaccination. Depuis ces premiers travaux, de nouvelles méthodes de constructions et des études sur des vecteurs non répliquatifs dans les cellules de mammifères ont été développées.

On dispose aujourd'hui d'un large ensemble de vecteurs dérivés de différents poxvirus, inoffensifs pour le manipulateur et pouvant être employés pour des études en culture cellulaire, chez l'animal ou chez l'homme. Convenablement atténués, ils constituent des vaccins recombinants intéressants non seulement chez leurs hôtes naturels mais également chez des hôtes hétérologues.

Les avantages liés à l'utilisation des poxvirus en tant que vecteurs viraux vaccinaux sont liés à :

- i. La flexibilité de leur génome. Ils peuvent tolérer des insertions de plus de 30 kpb au sein de leur génome sans perte d'infectivité (Smith *et al.*, 1984).
- ii. Leur grande capacité de croissance permettant la production de stocks importants de virus.
- iii. Leur multiplication exclusivement intra-cytoplasmique limitant les risques d'intégration ou de recombinaison génétique avec l'ADN de l'hôte.
- iv. Leur utilisation en tant que vaccins multivalents (Perkus *et al.*, 1991). Il est possible d'exprimer dans un même vecteur différents antigènes parfois simultanément (Perkus *et al.*, 1985).
- v. L'induction d'une immunité sur le long terme après une seule injection, en stimulant à la fois la réponse humorale et cellulaire contre le transgène (Andrew & Coupar, 1993 ; Zavala *et al.*, 2001 ; Pastoret & Vanderplass, 2003).
- vi. Leur très grande résistance et stabilité. En effet, ils résistent à de fortes chaleurs ainsi qu'à la lyophilisation (Collier, 1955). Ceci implique que les préparations vaccinales restent stables pendant de longues périodes. La thermostabilité des poxvirus représente un avantage dans les régions où la chaîne du froid est difficile à respecter.
- vii. Leur facilité et faible coût de production.
- viii. La possibilité de développer des techniques permettant une différenciation entre animaux vaccinés et infectés (Vaccins DIVA).

6-2 - Les poxvirus en tant que vecteurs d'expression

Le premier poxvirus recombinant à avoir été utilisé sur la faune sauvage est le recombinant vaccine rage, V-RG (Blancou *et al.*, 1986 ; Brochier *et al.*, 1989 ; Pastoret & Brochier, 1992) par la vaccination orale de renards. V-RG a été construit par insertion du gène codant pour la glycoprotéine du virus de la rage dans le gène de la thymine kinase (TK) de la souche Copenhague du virus de la vaccine (Kieny *et al.*, 1984). En raison de sa thermostabilité et de sa voie d'inoculation (voie orale), il a pu être distribué sous forme d'appâts pour immuniser la faune sauvage (Pastoret *et al.*, 1988). Son utilisation massive dans toute l'Europe a permis une élimination progressive de la rage (Brochier *et al.*, 1991 ; 2001).

Une multitude d'autres exemples de poxvirus recombinants est disponible. Ainsi, un vecteur vaccine exprimant les antigènes de surface du virus de l'hépatite B et de l'herpes virus et de l'hémagglutinine du virus influenza a engendré chez des lapins une réponse immunitaire dirigée contre les trois transgènes (Perkus *et al.*, 1985). D'autres succès vaccinaux sont également attribués aux vecteurs fowlpoxvirus (Skinner *et al.*, 2005) et canarypoxvirus atténués. Ainsi, le développement récent d'un vecteur fowlpoxvirus exprimant le gène de l'hémagglutinine H5 du virus influenza aviaire H5N1 s'est révélé d'une grande efficacité chez des poussins éprouvés avec une souche virulente (Bublott *et al.*, 2006). La souche ALVAC du canarypoxvirus est également très utilisée dans le domaine vétérinaire notamment contre le virus de la West-Nile (Minke *et al.*, 2004 ; Karacca *et al.*, 2005).

6-3 - Les capripoxvirus en tant que vecteurs d'expression

Le genre *Capripoxvirus* inclut les virus de la variole ovine ou clavelée du mouton, le virus de la variole caprine et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse ou Lumpy skin disease virus (LSDV). Ces virus sont responsables de maladies infectieuses, contagieuses, inoculables et infectant respectivement, les caprins, les ovins et les bovins. Les *Capripoxvirus* ont des propriétés immunologiques communes qui induisent une protection croisée entre les différents membres du genre (Kitching *et al.*,

1986). L'utilisation de souches atténuées protège ainsi contre les trois infections à *Capripoxvirus* (Kitching *et al.*, 1987).

En raison de sa spécificité d'hôte réduite et de son apathogénicité sur les hommes et les animaux, le virus de la dermatose nodulaire contagieuse est considéré comme un des vecteurs potentiels prometteurs dans le domaine vétérinaire. Un vaccin atténué LSDV exprimant des antigènes étrangers peut être utilisé à la fois contre une infection hétérologue et contre les infections à *Capripoxvirus*. Ainsi, ce système a été très largement utilisé dans la recherche de vaccins contre la peste bovine, la peste des petits ruminants (Romero *et al.*, 1993 ; Diallo *et al.*, 2002 ; Berhé *et al.*, 2003) et la fièvre de la vallée du rift (Wallace *et al.*, 2005 ; 2006). Romero *et al.*, 1994 ont montré que la souche KS-1 exprimant la protéine de fusion du virus de la peste bovine protège totalement le bétail contre une épreuve virulente de peste bovine et de LSDV. Le même type de résultats a été obtenu par Berhé *et al.*, 2003 avec un vaccin recombinant exprimant la protéine H du virus de la peste des petits ruminants avec l'obtention d'une protection totale même avec une dose aussi faible que 10^2 DICT₅₀ par animal.

CADRE ET OBJECTIFS

CADRE ET OBJECTIFS

L'objectif de ce travail est de contribuer à développer un vaccin dit de « nouvelle génération » permettant de protéger les animaux contre plusieurs sérotypes du virus de la FCO pour les petits ruminants après une seule injection.

Ce travail repose sur l'utilisation d'un vecteur d'expression qu'est le virus de la dermatose nodulaire contagieuse. Le choix des gènes exprimés s'est porté en priorité sur les gènes les mieux conservés entre sérotypes, à savoir les gènes codant pour les protéines non structurales, NS1, NS2, NS3 et le gène codant pour la protéine constitutive de la capsid interne, VP7. Nous avons également choisi d'inclure dans notre étude le gène codant pour la protéine de la capsid externe, VP2, portant un épitope neutralisant majeur, ceci afin de valider notre système vaccinal en épreuve homologue. Les vecteurs de type capripoxvirus induisent préférentiellement une réponse de type cellulaire contre le transgène, conférant théoriquement une immunité protectrice contre tous les sérotypes du virus.

Dans la littérature, la protection est souvent attribuée à la production d'anticorps neutralisants spécifiques du sérotype. Pour ne pas avoir à développer un vaccin multivalent, pour protéger contre plusieurs sérotypes, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'identifier des antigènes conservés qui pourraient être utilisés pour induire chez l'animal, une réponse immune protectrice contre plusieurs sérotypes. Il a été ainsi montré que les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) jouent également un rôle important chez le mouton dans la protection contre le virus de la FCO avec un pic maximal 14 jours après infection (Jeggo *et al.*, 1985). Ils reconnaissent fortement les protéines NS1 et un peu moins les protéines VP2, VP3, VP5 et VP7 (Janardhana *et al.*, 1999). Par ailleurs, les protéines NS2 et NS1 ont été montrées comme étant capables de générer des LTC chez la souris (Jones *et al.*, 1997) et chez le mouton (Andrew *et al.*, 1995).

L'objectif de ce projet était donc d'essayer de générer des LTC mémoires contre des antigènes conservés pour protéger l'espèce animale concernée contre un maximum de sérotypes. Les poxvirus sont connus pour induire des réponses immunitaires de type cellulaire et relativement peu d'anticorps neutralisants. Ils constituaient donc des vecteurs potentiellement intéressants au regard de notre objectif. En outre, un capripoxvirus recombinant VP7 avait déjà été produit et avait conféré une protection

contre le sérotype homologue et une protection partielle contre un sérotype hétérologue (Wade-Evans *et al.*, 1996). Notre objectif était donc d'évaluer la capacité de notre vecteur de type capripoxvirus à induire une réponse immunitaire contre différents antigènes conservés ou non et à tester cette réponse dans des essais de protection après une épreuve virulente chez les petits ruminants.

Le développement des vaccins poxviraux recombinants contre la FCO nécessite plusieurs étapes à savoir l'élaboration de constructions plasmidiques et leur validation *in vitro* (cf chapitre 3). L'évaluation de l'effet protecteur et des réponses immunitaires engendrées par ces capripoxvirus recombinants FCO est détaillée dans le chapitre 4.

**PARTIE II : DEVELOPPEMENT DE VACCINS POXVIRAUX
RECOMBINANTS EXPRIMANT DIFFERENTS GENES DU
VIRUS DE LA FIEVRE CATARRHALE OVINE ET
EVALUATION DE L'IMMUNOGENICITE INDUITE CHEZ
LES PETITS RUMINANTS**

Chapitre 3 - Elaboration et validation des constructions plasmidiques *in vitro*

Les techniques les plus couramment utilisées pour l'insertion de gènes rapporteurs au sein du génome des poxvirus sont basées soit sur une recombinaison homologue entre un plasmide de transfert et le génome du poxvirus (Mackett *et al.*, 1982 ; Piccini *et al.*, 1987) soit par ligation directe d'ADN (Timiryasova *et al.*, 2001). La technique qui a été utilisée au cours de ce projet est la technique de recombinaison homologue. Le principe de génération de capripoxvirus recombinants est le suivant : un plasmide de transfert contenant le gène d'intérêt et les parties flanquantes du site d'insertion choisi est transfecté *in vitro* dans des cellules préalablement infectées avec une souche vaccinale atténuée de capripoxvirus, dans notre cas, la souche KS-1. Il s'effectue alors entre le plasmide de transfert et l'ADN génomique viral du poxvirus, au niveau du site d'insertion choisi, une double recombinaison homologue. Dans notre cas, la cassette d'expression du plasmide de transfert s'intègre dans le gène de la thymidine kinase (TK), gène non essentiel à la survie du capripoxvirus. Le taux d'évènements de recombinaison, dans les cellules infectées par les poxvirus, est relativement faible, environ 1 pour 10 000 (Franke *et al.*, 1985) et la quasi-totalité de la population de virus néoformés reste de type parentale c'est-à-dire non recombinante (Moss, 1992).

Une fois les virus recombinants générés, il est alors possible d'entrer dans une phase de purification de ces derniers en éliminant les virus non recombinants par pression de sélection. De multiples approches ont été explorées afin de faciliter l'élimination des virus non recombinants et ainsi la sélection de virus recombinants purs:

- La sélection du phénotype négatif pour le gène de la thymidine kinase (TK-), est un moyen de sélection utilisé en routine pour la purification de recombinants basé sur le virus de la vaccine (Mackett *et al.*, 1984), mais ce moyen de sélection n'est pas aussi efficace que ce qui était attendu (Buller *et al.*, 1985 ; Taylor *et al.*, 1991). En effet, l'inactivation du gène TK génère des virus recombinants instables (Wallace & Viljoen, 2002).
- L'utilisation d'un marqueur de sélection positif permettant une sélection par :
 - Coloration, comme la β -galactosidase et la β -glucuronidase (GUS) (Chakrabarti *et al.*, 1985 ; Panicali *et al.*, 1986 ; Carroll & Moss, 1995).
 - Fluorescence, grâce à la GFP (green fluorescent protein) (Dominguez *et al.*, 1998, Wallace *et al.*, 2007).

- La résistance à un antibiotique tel que la néomycine (Franke *et al.*, 1985 ; Katz & Middle, 1990), la puromycine (Sanchez-Puig & Blasco, 2000) ou l'acide mycophénolique, MPA (Boyle & Coupar, 1988 ; Falkner & Moss, 1988).
- Plus récemment, Hansen *et al.*, ont développé une enzyme bi fonctionnelle (Bizyme) qui permettrait une sélection plus simple et plus rapide des virus recombinants (Hansen *et al.*, 2002).

Malgré la quantité de marqueurs disponibles, très peu s'avèrent réellement efficaces. De plus, les marqueurs de sélection visuelle (GUS, GFP...) permettent une visualisation des virus recombinants mais n'exercent aucune pression de sélection sur les virus sauvages et ne permettent donc pas leur élimination. Les antibiotiques, tels que la néomycine ou la puromycine engendrent une forte mortalité cellulaire sur de nombreuses lignées cellulaires. Le gène de la guanosine phosphoribosyl transférase d'*Escherichia coli* (*Ecogpt*), qui code pour une résistance à l'acide mycophénolique, s'avère être une des méthodes les plus efficaces et les plus couramment utilisées (Falkner & Moss, 1988 ; Romero *et al.*, 1993 ; 1994 ; Berhé *et al.*, 2003).

L'objectif de ce chapitre 3 est de décrire l'approche ayant permis la construction et la purification des capripoxvirus recombinants exprimant différents gènes du virus de la FCO.

1- Matériel et méthodes

1-1 - Virus et cellules

Le virus utilisé pour la génération des recombinants est la souche vaccinale Kenya Sheep - 1 (KS-1), isolée en 1974 (Davies, 1976) et atténuée par Kitching *et al.*, 1987. Cette souche vaccinale, produite par l'Institute of Animal Health (IAH, Pirbright, Angleterre), a été obtenue à partir de la souche virulente après deux passages sur culture de cellules de testicules d'agneaux, deux passages sur culture de cellules BHK21 et enfin quatre passages sur culture de cellules de reins d'agneaux.

La souche KS-1 est cultivée sur des cellules de testicules agneaux (OA3Ts, ATCC, CRL 6546) en milieu de Eagle modifié par Dulbecco, D-MEM (Gibco, USA) enrichi à 10 % en sérum de bovin fœtal (SBF). Les virus recombinants générés à partir de cette souche atténuée sont également cultivés sur cellules OA3Ts, en revanche le milieu de culture diffère par l'ajout d'agents de sélection (voir sa composition au paragraphe 1-3-2).

La souche sauvage Corse, sérotype 2, du virus de la FCO (Zientara *et al.*, 2000), ainsi que la souche vaccinale atténuée, sérotype 2 (OBP, South Africa), sont amplifiées sur des cellules de reins de singes (VERO), en milieu minimum essentiel, MEM (Gibco, USA) enrichi à 10 % en SBF et 1% en L-glutamine. La souche sauvage est produite en laboratoire de confinement niveau 3.

1-2 - Construction des plasmides de transfert

L'ARN double brin du virus de la FCO a été extrait à partir de 100 µl de surnageant de culture cellulaire de la souche sauvage Corse du sérotype 2 à l'aide du kit RNeasy Mini (Qiagen, USA) selon les instructions du fournisseur. L'ARN total est finalement repris dans un volume de 50 µl d'eau DEPC (0,1%). L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 10 µl d'ARN extraits à l'aide du kit First-Strand cDNA Synthesis (Amersham Biosciences, UK). Les ADNc correspondant à la totalité de chacun des gènes d'intérêts (VP2, VP7, NS1, NS2 et NS3) ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques de chaque gène (Annexe 1). Chaque gène a été cloné individuellement dans le plasmide pFastBac-HTA (Invitrogen, USA) pour les gènes NS1, NS2, NS3 et VP7 ou dans le plasmide TOPO-XL (Invitrogen, USA) pour le gène VP2. Ils ont été ensuite sous clonés individuellement dans le site de clonage multiple (EcoRI/NotI pour NS1 ; BamHI/NotI pour NS2 ; BamHI/NotI pour NS3; EcoRI pour VP2 et BamHI/NotI pour VP7) du plasmide de transfert pKSCATpSGPT (plasmide Bluescript II KS, Capripoxvirus, gène de la Thymidine kinase, promoteur Synthétique, gène de la GPT, figure 14), développé au CIRAD (Berhé *et al.*, 2003). Ce plasmide comporte également les parties flanquantes du gène de la TK (TK 5' et TK 3') permettant une recombinaison homologue au sein du génome du capripoxvirus (Boyle *et al.*, 1985).

1-3 - Elaboration des capripoxvirus recombinants FCO

1-3-1 - Validation de l'expression *in vitro* des capripoxvirus recombinants FCO

Chaque construction plasmidique est testée afin d'évaluer le niveau d'expression des gènes d'intérêt insérés. La validation *in vitro* de l'expression de chacun des gènes s'est faite de deux façons, par immunofluorescence sur cellules infectées et transfectées par les constructions plasmidiques et par la détection par PCR à partir d'ARN messagers extraits des mêmes cellules infectées. Brièvement, des plaques 96 puits sont préparées à raison de 3×10^4 cellules OA3Ts par cupule. Le jour suivant, les cellules à confluence sont infectées avec le KS-1 à un taux de multiplicité d'infection (MOI) de 1. Le virus infecte les cellules pendant 2 heures à 37°C et 5% de CO₂. Pendant ce temps, les solutions de transfection sont préparées en double dans les conditions optimales (milieu optiMEM, Gibco, USA) pour l'agent transfectant, la lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). La lipofectamine 2000 (2 µl) est mis en contact avec 0,2 µg d'ADN plasmidique. Après 2 h d'incubation, l'inoculum est retiré, les cellules sont lavées 2 fois avec du milieu de culture sans sérum afin d'éliminer l'excédent de virus non intégré aux cellules, puis le milieu de transfection est ajouté. Les cellules sont incubées 4 heures puis le milieu de transfection est remplacé par du milieu DMEM complet. Un contrôle de transfection, pEGFP (plasmide exprimant le gène de la Green Fluorescent Protein), considéré comme témoin positif, est traité selon le même protocole. Après 48h d'infection à 37°C, 5% CO₂, les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence afin d'évaluer l'efficacité de la transfection par le biais du contrôle positif. Une partie des cellules est fixée pour la réalisation de l'immunofluorescence et l'autre partie est récoltée pour une extraction d'ARNm.

Afin de valider l'expression des gènes, une réaction d'immunofluorescence est réalisée comme suit : les cellules sont fixées 30 minutes à -20°C à l'acétone froid 80% puis incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, 2% lait écrémé). Des anticorps polyclonaux anti- NS1/NS3/VP7 produits chez des lapins ou des anticorps totaux anti-FCO produits chez des chèvres sont ajoutés dilués au 1/250^{ème} dans du tampon de blocage. Après 30 minutes à 37°C, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS. Des anticorps anti-lapin ou anti-chèvre marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (anti-rabbit-FITC, anti-goats-FITC – Dako, USA) dilués au 1/50^{ème} dans du

tampon de blocage sont ajoutés et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages en PBS, l'observation est effectuée au microscope à fluorescence (Nikon, eclipse TE300).

Les ARNm sont extraits à partir des cellules à l'aide du kit «Oligotex direct mRNA extraction» (Qiagen, USA). Une hydrolyse à la DNase (Roche, France) est effectuée afin d'éliminer l'ADN plasmidique ayant servi à la transfection, puis la DNase est éliminée à l'aide du kit «RNeasy mini handbook» (Qiagen, USA) selon le protocole «RNA cleanup». Les ADNc sont produits à l'aide du kit «First-strand cDNA synthesis», (Amersham Biosciences, UK) à partir de 8 µl d'ARNm. Une première amplification par PCR est réalisée sur les ADNc à l'aide d'amorces spécifiques d'un gène de ménage, le gène de la β -actine (β -act1 / β -act2, Annexe 1) afin de vérifier l'intégrité et la qualité des ARNm extraits. Une deuxième PCR est réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de ces gènes (Annexe 1) sur les ADNc et sur les ARNm initiaux afin de vérifier qu'il n'y ait pas de contamination résiduelle par de l'ADN plasmidique. Les réactions de PCR se font dans un volume total de 50 µl réparti de la manière suivante : tampon 10x, 250 µM de chaque dNTP (Eurobio, France), 200 ng de chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase, 5 µl d'ADNc ou 1 µl d'ARNm. Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 5 ci-dessous.

Gènes	Amorces	Conditions d'amplification	taille des amplicons (pb)
β -Actine	β -Act-1/ β -Act-2	95°C / 3 min, 40 x [95°C / 30 sec, 55°C / 30 sec, 72 °C / 30 sec], 72 °C / 7 min	263 pb
NS1 BTV-2	NS1-F1 / NS1-R1	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 55°C / 1 min, 72 °C / 1 min], 72 °C / 7 min	723 pb
NS3 BTV-2	NS3-F1 / NS3-R1	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 1 min], 72 °C / 7 min	647 pb
VP2 BTV-2	VP2-F1 / VP2-R3	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 56°C / 1 min, 72 °C / 3 min], 72 °C / 7 min	2906 pb
VP7 BTV-2	VP7-F1/VP7-R1	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 55°C / 1 min, 72 °C / 1 min], 72 °C / 7 min	1050 pb

Tableau 5 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors des expressions *in vitro*.

1-3-2 - Transfection, purification et production des capripoxvirus recombinants FCO

Des cellules OA3Ts sont préparées en plaque 6 puits (NUNC, USA) à raison de 4×10^5 cellules par cupule en milieu DMEM, 10% SBF. Le lendemain, les cellules sont infectées et transfectées de la même manière que lors de l'expression transitoire et incubées pendant 24h à 37°C, 5% CO₂. Le milieu est alors remplacé par du milieu sélectif enrichi en acide mycophénolique (MPA), préparé extemporanément. Le milieu sélectif est préparé avec du DMEM enrichi à 10% en SBF, 1% en antibiotiques, acide

mycophénolique (MPA) 100 µg/ml (Sigma), xanthine 300 µg/ml (Sigma), hypoxanthine 27,7 µg/ml (Sigma) (Romero *et al.*, 1993). Ce milieu va permettre la sélection des virus recombinants possédant le marqueur *Ecogpt*. Le virus parental, ne possédant pas le gène de sélection, sera partiellement éliminé. Les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ jusqu'à apparition d'un effet cytopathique (ECP). Des puits témoins cellules non infectées soit en milieu normal soit en milieu sélectif, sont présents dans l'expérimentation afin de vérifier l'évolution de l'ECP et l'effet toxique possible du milieu sélectif sur les cellules.

Après apparition d'un ECP, un premier passage en milieu sélectif liquide puis un second en milieu sélectif sous agarose sont effectués afin de purifier au maximum et d'isoler un clone recombinant. Les cellules, à confluence, sont pré-incubées 24 h avant l'infection avec du milieu sélectif. Les surnageants récoltés subissent ensuite des dilutions sérielles de 10 en 10 (10^1 à 10^{-5}) sous sélection *Ecogpt* dans des plaques 96 puits. Entre chaque passage, les surnageants de culture subissent trois cycles de congélation (-80°), décongélation (37°C) ainsi qu'un passage aux ultrasons afin de dissocier les particules virales et de les libérer des cellules puis une centrifugation à faible vitesse afin d'éliminer les débris cellulaires. La présence des virus recombinants ainsi que leur degré de pureté est évalué à la fois par immunofluorescence et par PCR spécifiques.

1-3-3 - Vérification par PCR de la présence des gènes insérés

Une méthode d'amplification par PCR a été développée afin de confirmer la présence ainsi que la pureté des recombinants sélectionnés. Plusieurs couples d'amorces ont ainsi été définis à partir des séquences du gène de la thymidine kinase et des gènes de la FCO (Annexe 1). Ces différents lots d'amorces nous ont permis :

- de discriminer les virus recombinants, des virus non recombinants, au travers d'une amplification de taille variable en fonction de l'intégration ou non de la cassette d'expression au sein du génome du capripoxvirus (CPTK9/CPTK10) (figure 16a., 16b.)
- d'amplifier uniquement les virus recombinants, grâce à un couple d'amorces défini à la fois sur le gène de la thymidine kinase et sur le gène d'intérêt (CPTK9/FCO 2-F1) (figure 16a). Les amplicons générés par cette PCR sont de tailles plus petites que ceux obtenus avec le premier lot d'amorces et sont donc généralement plus faciles à générer.

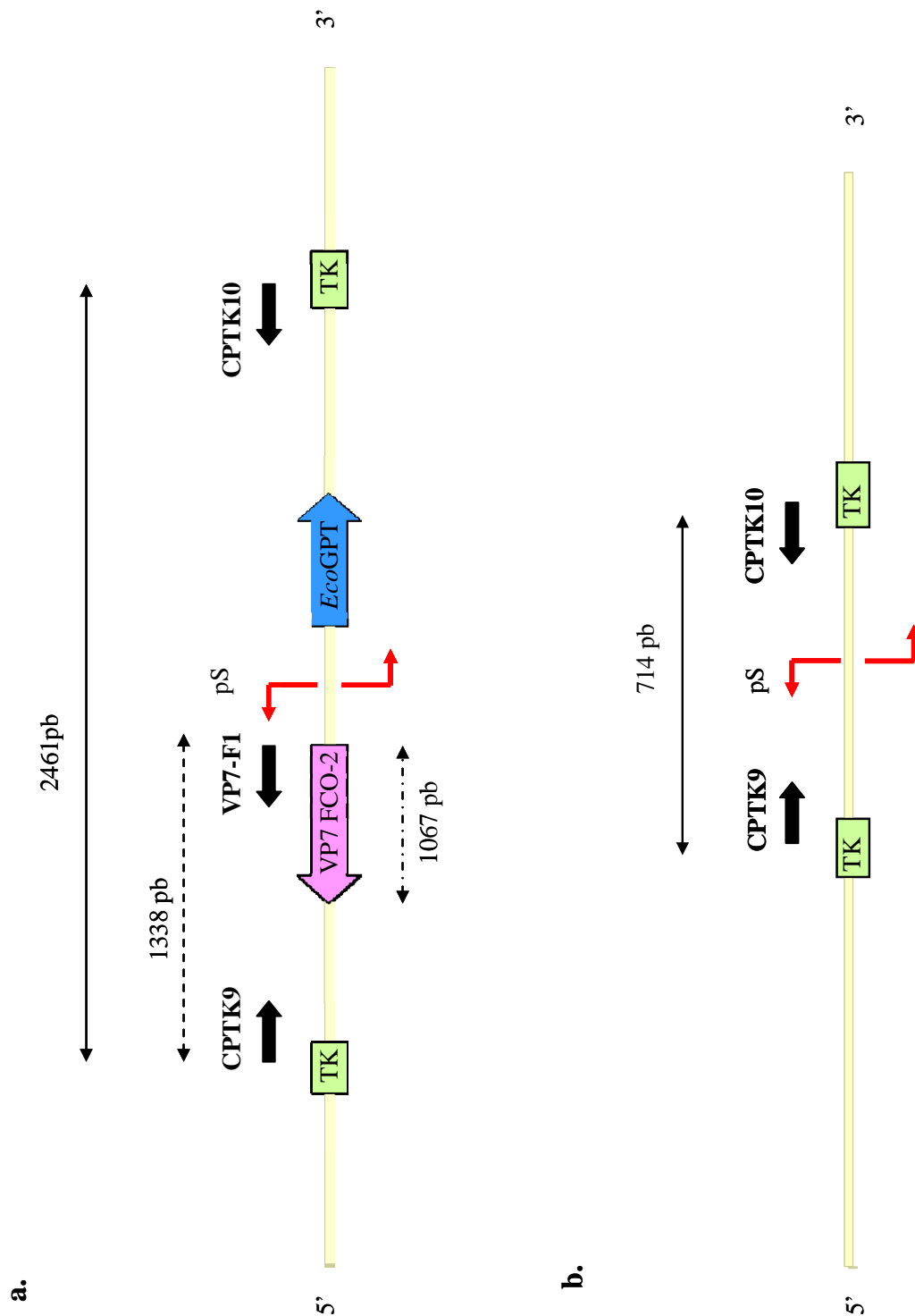


Figure 16 - Représentation schématique des tailles d'amplicons obtenues au cours des processus de sélection par PCR des capripoxvirus recombinants. **a.** Virus recombinants CpoX-VP7 et **b.** Virus parentaux non recombinants.

Pour ces PCR, l'ADN viral est extrait à partir de 200 µl de suspension virale avec le kit "Qiamap DNA MiniKit" (Qiagen, USA) selon les instructions du fournisseur. Les virus recombinants sont amplifiés avec les amorces CPTK9/FCO-2-F1 spécifiques de chaque gène et les virus recombinants et parentaux sont amplifiés avec les amorces CPTK9/CPTK10. Cette dernière réaction de PCR nous permettra de juger du degré de pureté des suspensions virales. Les réactions de PCR se font dans un volume final de 50 µl réparti de la manière suivante : tampon 10x (Qiagen, USA), 250 µM de chaque dNTP (Eurobio, France), 200 ng de chaque amorce, 2,5 U de Taq polymérase (Qiagen, USA) et 5 µl d'ADN viral. Pour chacun des gènes d'intérêts, deux PCR sont effectuées afin de valider la présence des virus recombinants et de vérifier le niveau de pureté des suspensions virales. Les conditions d'amplification ainsi que les tailles attendues des amplicons sont résumées dans le tableau 6 ci-dessous. Les produits d'amplification sont visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium.

Recombinants	Amorces	Conditions d'amplification	Taille théorique attendue (pb)
Cpox-NS1	CPTK9/NS1-F2	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 2 min], 72 °C / 10 min	1379 pb
	CPTK9/CPTK10	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 3 min], 72 °C / 10 min	3061 pb
Cpox-NS3	CPTK9/NS3-F1	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 53°C / 1 min, 72 °C / 1 min], 72 °C / 10 min	935 pb
	CPTK9/CPTK10	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 2 min], 72 °C / 10 min	2161 pb
Cpox-VP2	CPTK9/VP2-F1	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 3 min], 72 °C / 10 min	3194 bp
	CPTK9/CPTK10	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 4'30 min], 72 °C / 10 min	4361 pb
Cpox-VP7	CPTK9/VP7-F1	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72 °C / 2 min], 72 °C / 10 min	1338 pb
	CPTK9/CPTK10	94°C / 5 min, 30 x [94°C / 1 min, 50 °C / 1 min, 72 °C / 3 min], 72 °C / 10 min	2461 pb

Tableau 6 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors du processus de sélection.

1-3-4 - Vérification de l'expression protéique des gènes FCO, par immunofluorescence

La production de protéines par les virus recombinants lors des dilutions sérielles peut également être évaluée par immunofluorescence. La technique utilisée est la même que celle employée lors de l'expression *in vitro* des virus recombinants (cf paragraphe 1-3-1).

1-4 - Production et titrage des capripoxvirus recombinants FCO

Une production de chaque recombinant cloné (vérification de l'absence de virus non recombinant) est effectuée en flacons de culture 150 cm² de type T150 (Falcon, USA). Une fois le volume désiré obtenu, un titrage en milieu sélectif est effectué selon la méthode de Spearman (Johnson *et al.*, 1961).

2 - Résultats

2-1 - Vérification des constructions plasmidiques

L'exemple du gène VP7 sera détaillé dans ce paragraphe. Les différentes étapes ayant permis sa construction finale sont les suivantes:

- Amplification par RT-PCR à partir de l'ARN. La figure 17 présente les résultats de l'amplification par PCR du segment 7 (VP7) du sérotype 2 Corse de la FCO sur gel d'agarose 1% avec BET. Une amplification spécifique à la taille attendue de 1067 pb est observée dans le puits ADNc FCO-2. Aucune amplification n'est obtenue dans le contrôle négatif (-).

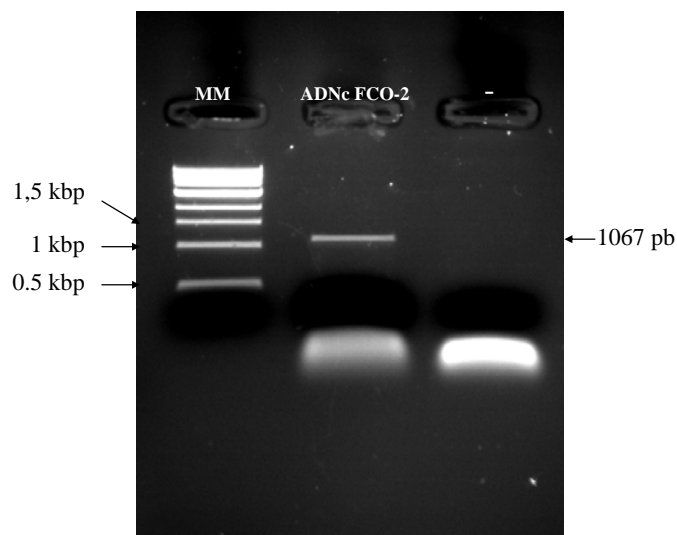


Figure 17 - Amplification par PCR du gène VP7 de la FCO, sérotype 2. **MM** : Marqueur de poids moléculaire 1 kb (Biolabs, UK), **ADN FCO-2** : échantillon ADNc FCO du sérotype 2 Corse. **-** : contrôle négatif.

- Vérification de l'insertion du gène dans le plasmide de transfert par criblage des différentes colonies. La figure 18 présente quant à elle, un gel d'agarose 1% + BET avec les résultats de PCR spécifiques du gène VP7 (VP7 F1 – VP7 R1) de différents clones après transformation bactérienne avec *E. Coli*. Les quatre clones présentés dans cette figure (1 à 4) sont positifs avec l'obtention d'une bande à la taille attendue de 1067 pb. Les contrôles négatifs et positifs correspondent aux résultats attendus.

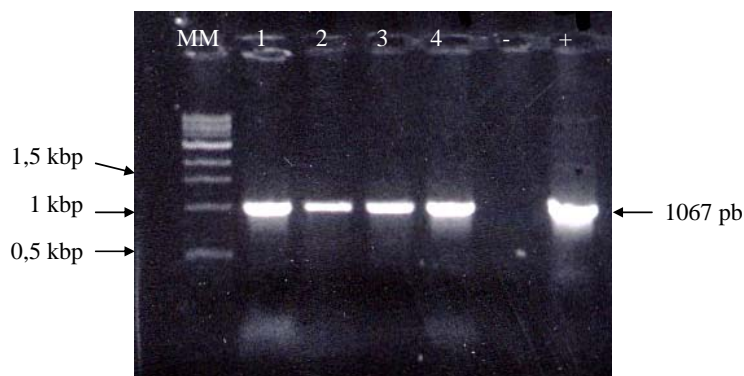


Figure 18 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du pKSCATpSGPT-VP7. MM : Marqueur de poids moléculaire 1 kb, 1 à 4 : colonies bactériennes, - : contrôle négatif, + : contrôle positif.

- Validation du clone choisi par digestion enzymatique (résultats non présentés). Une double digestion enzymatique BamHI/NotI est effectuée sur chacune des mini-préparations obtenues après le criblage bactérien afin de confirmer l'insertion du gène VP7 dans le plasmide de transfert. Deux bandes spécifiques à 4400 pb et 1067 pb ont été obtenues pour les échantillons testés correspondant respectivement au plasmide de transfert et au gène d'intérêt VP7.
- Finalement, un clone unique est amplifié puis purifié avec le kit Endofree plasmid maxi (Qiagen, USA). Après validation par séquençage, la construction peut être utilisée pour la suite du processus de génération des virus recombinants.

Quatre plasmides de transfert différents ont ainsi été obtenus, exprimant individuellement les gènes NS1, NS3, VP2 et VP7 du virus de la FCO. La construction, avec le gène codant pour la protéine non structurale NS2 n'a jamais abouti à un résultat satisfaisant.

2-2 - Validation de l'expression des capripoxvirus recombinants FCO

2-2-1 - Expression *in vitro*

L'objectif de ce paragraphe est la validation par expression transitoire de la fonctionnalité *in vitro* de chacune des constructions plasmidiques. L'expression des gènes d'intérêt peut se mesurer de plusieurs façons et notamment par la technique d'immunofluorescence quand des anticorps spécifiques de chacune des protéines sont disponibles. Seuls les anticorps anti-VP7 nous ont donné des résultats corrects et sont présentés ici.

La figure 19 présente le témoin négatif (a) et le témoin positif de transfection (b) correspondant respectivement aux cellules OA3Ts non infectées et aux cellules transfectées avec un plasmide exprimant la «green fluorescent protein». Ces contrôles ont suivi le même protocole de fixation et de marquage que les échantillons. La figure 19 (c) présente le niveau d'expression du plasmide de transfert exprimant le gène de la VP7, pKSCATpSGPT-VP7.

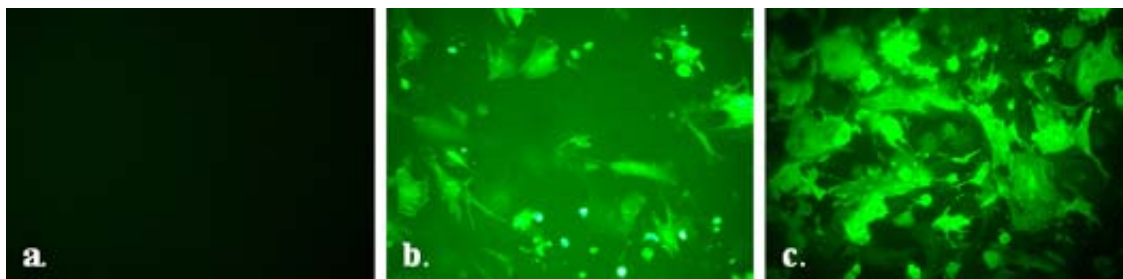


Figure 19 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 dans des cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP7. **a.** témoin négatif cellules, **b.** témoin positif de transfection pEGFP, **c.** pKSCATpSGPT-VP7 après 48h d'incubation. (Microscope optique à fluorescence x10).

Les anticorps anti-NS1, anti-NS3 et anti-FCO totaux n'ont pas donné de résultat satisfaisant et ne permettent pas la validation de l'expression des plasmides de transfert portant les gènes NS1, NS3 et VP2. Le choix de la validation de leur expression s'est orienté sur la technique de RT-PCR à partir de l'ARNm présentée en figures 20 et 21.

Afin de vérifier la qualité des ARNm extraits, une PCR spécifique du gène de la β -actine est réalisée. Pour chacune des constructions plasmidiques (pKSCATpSGPT-

NS1/NS3/VP2 et VP7), une amplification spécifique à 263 pb est obtenue. Ce résultat permet de statuer sur la qualité correcte de l'ARNm extrait pour chacune des expressions *in vitro*.

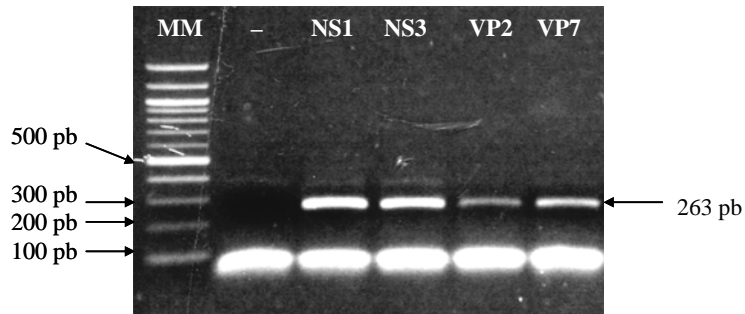


Figure 20 - Amplification par PCR du gène de la β -actine au cours de l'expression *in vitro* des plasmides de transfert. **MM** : Marqueur de poids moléculaire 100 pb (Biolabs, UK), **-** : témoin négatif, **NS1, NS3, VP2, VP7** : ADNc issus de l'ARNm extrait à partir des expressions *in vitro* des différentes constructions plasmidiques.

La figure 21 correspond à un gel d'agarose (1% TBE + BET) présentant les produits d'amplification obtenus après une PCR spécifique des gènes d'intérêts. Seuls les résultats concernant l'expression *in vitro* des plasmides de transfert exprimant le gène VP7 et le gène NS3 sont considérés comme corrects. Une amplification spécifique a été obtenue pour les ADNc pour chacun de ces deux gènes alors qu'aucune amplification n'est obtenue à partir des extraits d'ARNm. Ce résultat permet de valider leur expression *in vitro*. Les résultats obtenus pour les plasmides pKSCATpSGPT-NS1 (figure 22) et pKSCATpSGPT-VP2 ne sont pas satisfaisants puisqu'une amplification spécifique a été obtenue à partir des extraits d'ARNm pour chacun de ces gènes. Ceci ne permet donc pas de valider leur expression transitoire *in vitro*. Toutefois, leur expression sera vérifiée directement à partir des capripoxvirus recombinants.

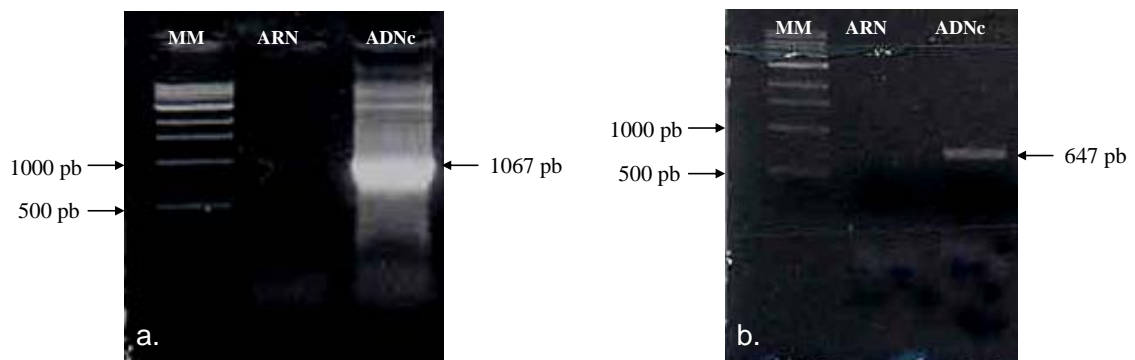


Figure 21 - Amplification par PCR des gènes d'intérêt FCO au cours de l'expression *in vitro* des plasmides de transfert. **a.** pKSCATpSGPT-VP7, **b.** pKSCATpSGPT-NS3. **MM** : Marqueur de poids moléculaire 1 kb, **ARNm** : ARN messager, **ADNc** : ADN complémentaires issus des ARNm.

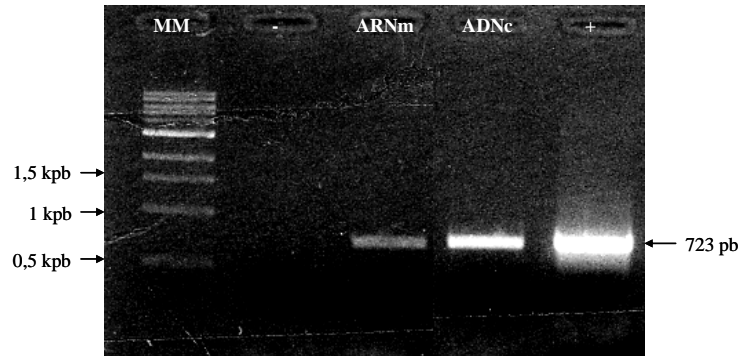


Figure 22 - Amplification par PCR du gène NS1 de la FCO au cours de l'expression *in vitro* du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-NS1. **MM** : Marqueur de poids moléculaire 1 kb, **-** : contrôle négatif, **ARNm** : ARN messager, **ADNc** : ADN complémentaires issus des ARNm, **+** : contrôle positif.

2-2-2 - Purification

A chaque étape de sélection et de production des capripoxvirus recombinants, l'observation d'un effet cytopathique permet de statuer sur le moment et de récolter les lysats cellulaires. La figure 23 présente un effet cytopathique induit par le capripoxvirus recombinant NS1 (b), lors d'un premier passage en milieu sélectif liquide comparativement au témoin négatif (a).

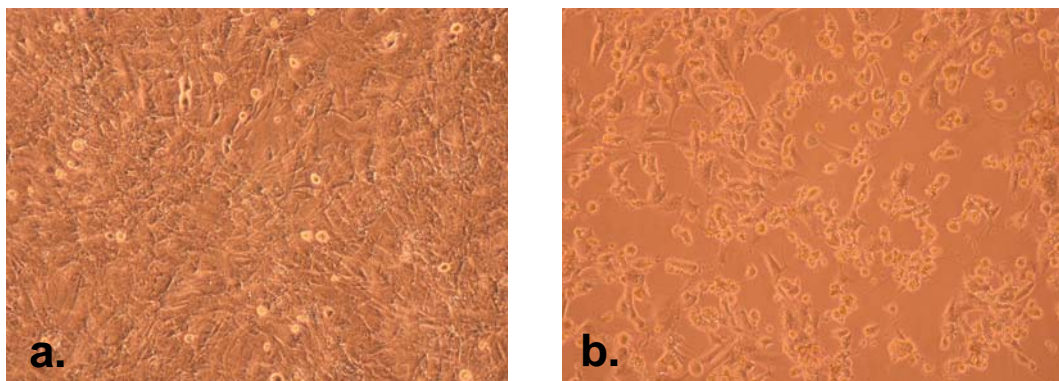


Figure 23 - Effet cytopathique observé au microscope optique (x4) sur des cellules OA3Ts infectées par le recombinant CpoX-NS1, en milieu sélectif liquide. **a.** Contrôle négatif correspondant à des cellules OA3Ts non infectées **b.** Cellules OA3Ts transfectées avec le recombinant CpoX-NS1.

La figure 24 présente un effet cytopathique, obtenu pour le même virus recombinant, lors d'un second passage en milieu sélectif sur agarose. L'effet cytopathique se présente sous forme d'une plage de lyse correspondant à un clone unique du virus recombinant.

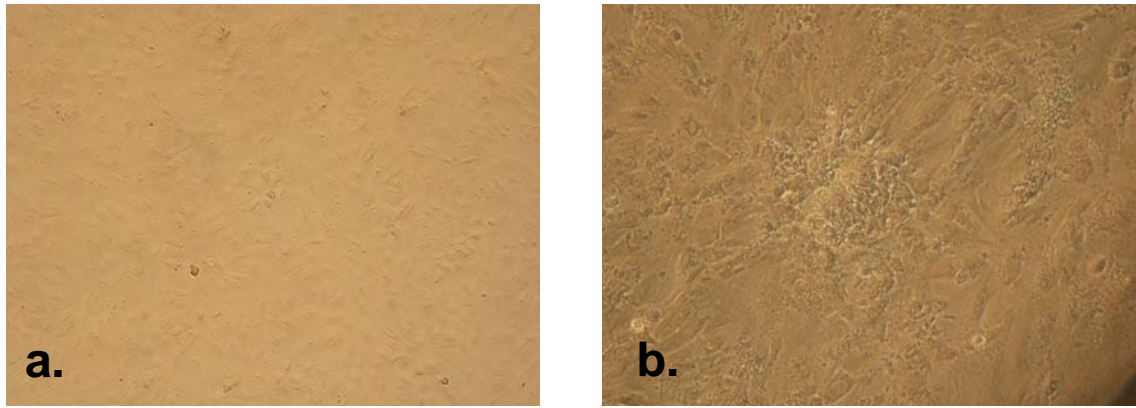


Figure 24 - Effet cytopathique observé en microscopie optique (x4) sur des cellules OA3Ts infectées avec le recombinant Cpox-NS1, en milieu sélectif avec agarose. **a.** Contrôle négatif correspondant à des cellules OA3Ts non infectées **b.** Cellules OA3Ts transfectées avec le recombinant Cpox-NS1.

Après les différentes étapes de purification (passage en milieu liquide, en agarose, plusieurs séries de dilutions limites), la pureté du clone obtenu peut être analysée par deux techniques complémentaires : l'immunofluorescence et l'amplification par PCR spécifique de chacun des gènes d'intérêt.

2-2-2-1 - Analyse par immunofluorescence

Seuls les anticorps anti-VP7 ont permis l'évaluation de la pureté des dilutions limites effectuées. La figure 25 présente les résultats d'IF obtenus pour la dilution limite n°3 concernant le recombinant Cpox-VP7. L'observation d'une fluorescence se fait jusqu'à la dilution au 1/1000^{ème}. Les surnageants de cette dernière dilution serviront pour l'étape de purification suivante.

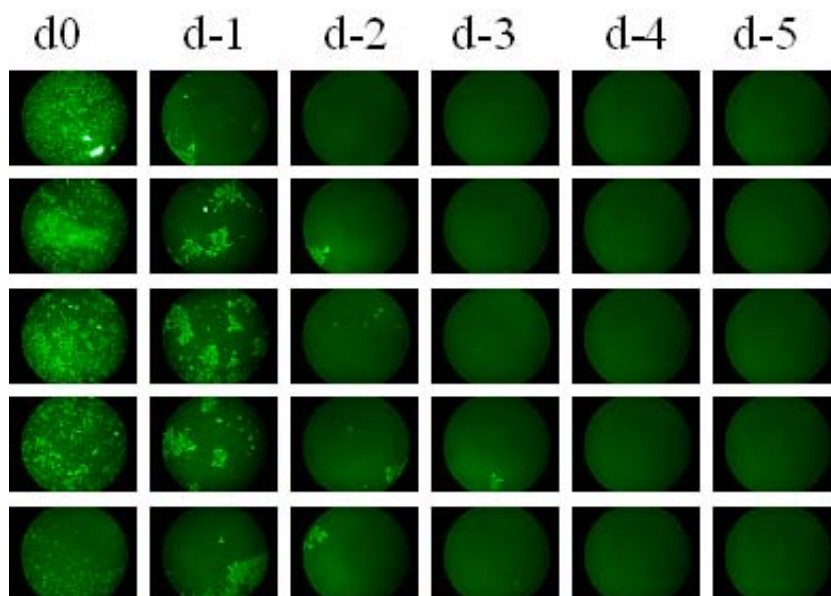


Figure 25 - Détection des anticorps anti-VP7 par immunofluorescence lors des dilutions sérielles du virus recombinant CpoX-VP7.

2-2-2-2 - Evaluation de la pureté par PCR

L'analyse par PCR de surnageants de culture cellulaire est effectuée lors de l'étape des dilutions sérielles en milieu liquide. Après observation d'un ECP, l'ADN viral est extrait à partir des surnageants de culture. Les gels d'agarose 1% TBE + BET illustrés en figures 26, 27, 28 et 29 présentent les résultats d'amplification par PCR obtenus pour les recombinants NS1, NS3, VP2 et VP7 lors du processus de purification en milieu sélectif.

Le gel présenté en figure 26a présente les résultats d'amplification du virus recombinant CPox-NS1, avec le lot d'amorce CPTK9 / CPTK10. Une amplification à 714 pb correspondant au virus parental est obtenue. L'intensité de la bande obtenue décroît au fur et à mesure des dilutions jusqu'à s'éteindre à la cinquième dilution. Une deuxième bande spécifique, à 3061 pb, correspondant au capripoxvirus recombinant NS1 est obtenue jusqu'à la dernière dilution où il y a absence du virus parental. Une confirmation de la présence du virus recombinant est obtenue grâce à une deuxième amplification avec le lot d'amorce CPTK9 / NS1-F2 (b). Des amplifications spécifiques de forte intensité, à 1379 pb sont obtenues pour chacune des dilutions concernées. On peut conclure quand à la pureté du virus recombinant CpoX-NS1 à la dilution sérielle n°5. Le passage en phase de production se fera à partir de cette dilution.

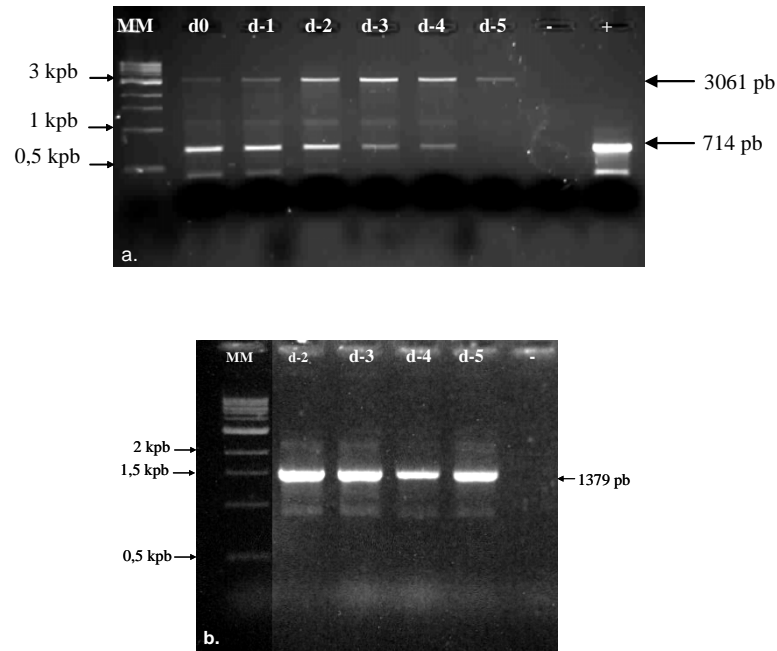


Figure 26 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-NS1. **a.** PCR recombinant/sauvage CPTK9/CPTK10 **b.** PCR recombinant CPTK9/NS1-F1. **MM** : marqueur de poids moléculaire, **d0 à d-5** : dilutions sérielles, **-** : contrôle négatif, **+** : contrôle positif correspondant à de l'ADN KS-1 (a).

Les gels des figures 27a et 27b présentent les résultats d'amplification du virus recombinant CPox-NS3 avec le lot d'amorce CPTK9 / CPTK10 et CPTK9/ NS3-F1. Une amplification du virus recombinant CpoX-NS3 est obtenue uniquement à la dilution au 1/10^{ème} (figure 27b, amplification à 935 pb). Malheureusement, une amplification spécifique est également obtenue à 714 pb correspondant au virus parental. On ne peut donc pas conclure quand à la pureté de ce virus recombinant. D'autres dilutions limites ont été nécessaires pour purifier ce virus recombinant CPox-NS3 (résultats non montrés).

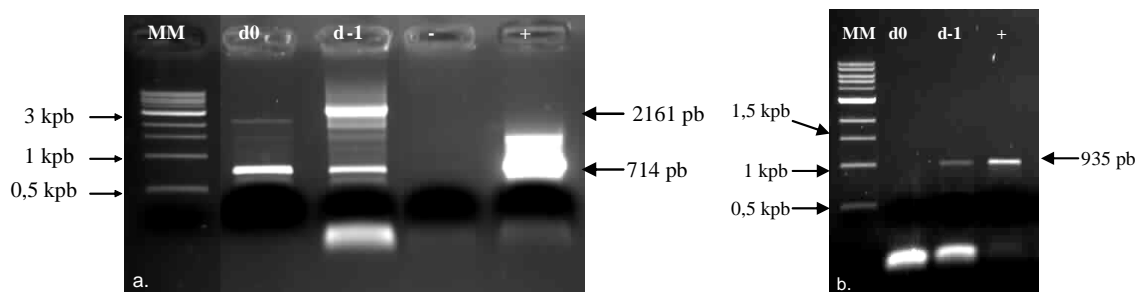


Figure 27 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-NS3. **a.** PCR recombinant/sauvage CPTK9/CPTK10 **b.** PCR recombinant CPTK9/NS3-F1. **MM** : marqueur de poids moléculaire, **d0 à d-1** : dilutions sérielles, **-** : contrôle négatif, **+** : contrôle positif correspondant à de l'ADN KS-1 (a) et l'ADN du recombinant, respectivement (b).

Pour le virus recombinant CpoX-VP2, une amplification spécifique du gène VP2 est obtenue en dilution d0 avec la présence d'une bande à 3194 pb, avec le lot d'amorce CPTK9/CPTK10 (figure 28). Aucune amplification du virus parental n'est obtenue.

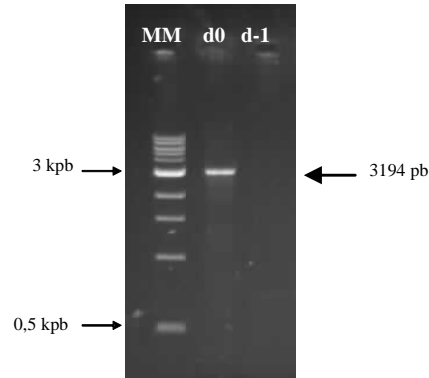


Figure 28 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-VP2. PCR recombinant/sauvage CPTK9/VP2F1. **MM** : marqueur de poids moléculaire, **d0**, **d-1** : dilutions sérielles.

Concernant le recombinant CpoX-VP7, la présence d'une bande spécifique est obtenue à 1338 pb (figure 29b.) à la dilution d0. Toutefois, le virus parental est également présent à cette dilution (figure 29a.). Cet exemple démontre l'intérêt d'utiliser deux lots d'amorces. En effet avec le premier lot d'amorce (CPTK9/CPTK10) aucune amplification du recombinant n'est observé alors qu'avec le deuxième lot d'amorce (CPTK9/VP7-F1) il y a bien une amplification spécifique. D'autres dilutions limites ont été nécessaires pour purifier ce virus recombinant CpoX-VP7. La technique de PCR est utilisée en complément de la technique d'IF pour le virus recombinant exprimant la VP7.

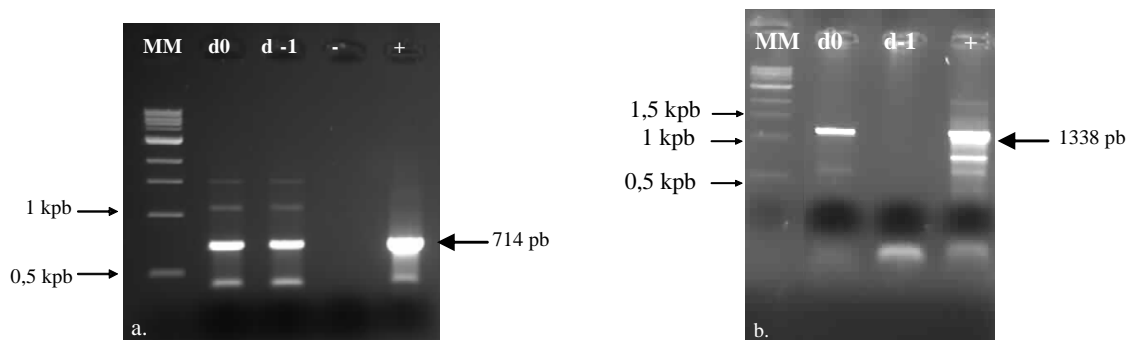


Figure 29 - Amplifications par PCR lors des processus de purification du recombinant CpoX-VP7. **a.** PCR recombinant/sauvage CPTK9/CPTK10 **b.** PCR recombinant CPTK9/VP7-F1. **MM** : marqueur de poids moléculaire, **d0**, **d-1** : dilutions sérielles, **-** : contrôle négatif, **+** : contrôles positifs correspondant respectivement à de l'ADN KS-1 (a) et de l'ADN du virus recombinant (b).

3- Conclusion

Quatre capripoxvirus recombinants pour la FCO, Cpox-NS1, Cpox-NS3, Cpox-VP2 et Cpox-VP7 ont été générés et purifiés. La pression de sélection sur le gène *Ecogpt*, a du être maintenue pour éviter un retour rapide du virus parental. En moyenne, une 10^{aine} de passages en dilutions limites ont été nécessaires pour obtenir des virus recombinants purs.

Une fois les virus recombinants validées pour chacun des gènes de la FCO, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la réponse immunitaire ainsi que le niveau de protection engendré par ces constructions. Ce travail est présenté dans le chapitre 4 ci-dessous.

Chapitre 4 - Démonstration de l'effet protecteur des capripoxvirus recombinants

FCO

Beaucoup de travaux de recherches sur la souche vaccinale atténuée du virus de la dermatose nodulaire contagieuse ont été menés ces dernières années. La souche Kenyan Sheep-1 (KS-1) a notamment été utilisée pour l'expression de gènes des virus de la peste bovine, de la peste des petits ruminants et de la fièvre catarrhale ovine (Romero *et al.*, 1993 ; Romero *et al.*, 1994 ; Wade-Evans *et al.*, 1996 ; Berhé *et al.*, 2003). Des données générées après vaccinations en conditions expérimentales ou de terrain avec la souche KS-1 ont confirmé l'innocuité et l'absence de pouvoir de diffusion de cette souche vaccinale sur des moutons et des chèvres (Romero *et al.*, 1993).

L'objectif de ce quatrième chapitre est d'évaluer l'effet immunogène des constructions de capripoxvirus recombinants élaborés à partir des quatre gènes NS1, NS3, VP2, VP7 de la FCO. Cette évaluation n'a pu se faire que par le biais d'expérimentations animales avec deux modèles : caprin et ovin.

Une première expérimentation animale, a été envisagée chez les chèvres afin de visualiser la cinétique de séroconversion et la dynamique des réponses cellulaires suite à une infection avec la souche atténuée KS-1. Une seconde expérimentation animale, également chez les chèvres a permis de tester l'immunogénicité des constructions capripoxvirus exprimant différents gènes de la FCO. Une troisième expérimentation a consisté à reproduire les résultats chèvres chez le mouton puis à tester l'effet protecteur des réponses induites, après épreuve virulente avec la souche sauvage FCO sérotype 2.

1- Immunisation de chèvres avec la souche vaccinale KS-1

1-1 - Matériel et méthodes

1-1-1 - Modèle d'étude

Six chèvres de race Saanen ont été réparties en deux lots, un lot témoin composé de 2 chèvres, inoculées par voie sous cutané (SC) avec du milieu de culture utilisé pour

l'entretien des cellules OA3Ts et un lot vacciné, composé de 4 chèvres inoculées par voie sous cutanée avec une dose de 10^4 DICTD₅₀ de la souche vaccinale atténuée KS-1.

Des prélèvements sur tubes héparinés et tubes secs ont été effectués hebdomadairement, depuis le jour de l'immunisation jusqu'à 4 semaines après l'injection afin d'évaluer les réponses immunitaires cellulaires et humorales, respectivement.

1-1-2 - Evaluation de la réponse immunitaire

1-1-2-1 - Recherche d'anticorps par la technique d'immunofluorescence

La présence d'anticorps anti-capripox, dans les sérums caprins, est testée par immunofluorescence de la manière suivante. Des plaques 96 puits sont préparées à raison de 2×10^4 cellules OA3Ts par cupule. Le jour suivant, les cellules à confluence sont infectées avec la souche atténuée KS-1 avec une dose de 100 DICT₅₀. Le virus est laissé en contact avec les cellules pendant 2 heures à 37°C, 5% CO₂ puis du milieu de culture complet est rajouté. Après 48h d'incubation à 37°C, 5% CO₂, les cellules sont fixées à -20°C pendant 30 minutes avec de l'acétone 80%.

Les cellules, perméabilisées pendant 30 minutes avec du Triton 100X à 0,2%, sont incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, gélatine 0,2%). Les sérums caprins sont ajoutés en double dilués au 1/50^{ème} dans du tampon de blocage. Après une incubation de 30 minutes à 37°C et trois rinçages avec du tampon de blocage, des anticorps anti-chèvre FITC (F0250 - Dako, USA) dilués au 1/50^{ème} dans du tampon de blocage sont ajoutés. Après trois rinçages en PBS, l'observation de la fluorescence est effectuée au microscope (Nikon, eclipse TE300). Des cellules non infectées servent de témoins négatifs.

1-1-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire

Il a été choisi d'évaluer la réponse cellulaire au travers de deux aspects :

- L'estimation de la prolifération et le typage des sous populations lymphocytaires après restimulation avec l'antigène total KS-1.
- Le dosage de cytokines.

Pour se faire, les cellules mononuclées (PBMCs ou Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolées à partir du sang périphérique, dilué au 1/2, sur milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio, France). Après lavage, les cellules sont resuspendues dans du milieu RPMI (Sigma, USA) enrichi à 10% SBF et 1% L-glu et re-stimulées avec l'antigène total KS-1. Les contrôles négatifs et positifs sont soit du milieu de culture seul soit un milieu de culture contenant un mitogène, la concanavaline A à la concentration finale de 5 µg/ml (ConA, Sigma, USA). Les surnageants de culture, récoltés après 4 et 7 jours de re-stimulation ont permis le dosage d'interféron gamma (IFN γ) par ELISA avec le kit «Bovigam, Bovine Gamma Interferon Test» (CSL Veterinary, Australia). L'activité des cellules est évaluée par passage au cytomètre en flux (FACSort, Becton Dickinson). Tous les lymphocytes quiescents présentent une apparence uniforme de cellules rondes de petite taille avec un noyau dense et peu de cytoplasme. Les lymphocytes activés se multiplient rapidement et forment des structures appelées blastes. Afin de phénotyper et quantifier les sous-populations fonctionnelles (lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8, lymphocytes B, lymphocytes $\gamma\delta$), des doubles-marquages spécifiques sont effectués (tableau 7). Les anticorps primaires sont incubés avec les cellules pendant 10 minutes à température ambiante. Après deux lavages en PBS, les anticorps secondaires marqués à l'aide de fluorochromes, Fluorescein Isothiocyanate (FITC), R-Phycoerytherin (PE) ou tri-Color (TC), dilués de façon appropriée, sont ajoutés 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont lavées une dernière fois et analysées au cytomètre en flux à l'aide du logiciel CellQuest 3.01. Les informations apportées par la cytométrie en flux concernent la taille (Forward Scatter – FSC), la granularité (Side Scatter – SSC) et l'intensité de fluorescence émise par la cellule (FL-1, FL-2 ou FL-3). Les différents fluorochromes utilisés émettent sur des longueurs d'ondes différentes. Ainsi, FITC émet sur FL-1 à une longueur d'onde de 515 nm, PE émet sur FL-2 à 585 nm et TC émet sur FL-3 à 667 nm. Lors de l'acquisition des données, chaque évènement apparaît sous forme d'un point. Après 10 000 évènements, on obtient un nuage de points, ou dot plot, représentatif des populations cellulaires acquises. L'analyse de ces populations cellulaires pourra se faire en fonction des caractéristiques physiques des cellules (FSC / SSC) ou de la fluorescence émise (FSC / FL-1 ou FL-2 ou FL-3 pour un simple marquage ; FL-1, 2 ou 3 / FL-1, 2 ou 3 pour des doubles-marquages).

Cellules cibles	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Lymphocytes T $\gamma\delta$	CC15 IgG2a (Serotec, UK), 1/10 ^{ème}	IgG2a-FITC (fluorescein, FL-1), 1/100 ^{ème}
Lymphocytes T CD4	GC50A1 IgM (VMRD, USA), 1/1000 ^{ème}	IgM-PE (phycoerytherin, FL-2), 1/100 ^{ème}
Lymphocytes T CD8	7C2 IgG2a (ILRI, Kenya), 1/2	IgG2a-FITC (fluorescein, FL-1), 1/100 ^{ème}
Lymphocytes B	Du2-104 IgM (aimablement fourni par le Dr Hein, Bâle, Suisse), 1/4	IgG2a-FITC (fluorescein, FL-1), 1/100 ^{ème}
Récepteurs IL2 (CD25)	CACT116A IgG1 (VMRD, USA), 1/1000 ^{ème}	IgG1-TC (Tri-color, FL-3), 1/80 ^{ème}

Tableau 7 - Liste des anticorps I^{aires} et II^{aires} utilisés pour le typage des populations lymphocytaires.

1-2 - Résultats

1-2-1 - Evaluation de la réponse humorale

La présence d'anticorps anti-capripoxvirus dans les sérums caprins est évaluée par immunofluorescence. Les contrôles négatifs ne présentent aucune fluorescence ainsi que les puits correspondants aux deux chèvres témoins (figure 30b). Les puits correspondants aux chèvres immunisées avec le KS-1 présentent déjà une fluorescence deux semaines (J14) après l'injection et ce jusqu'à 5 semaines (J35) (figure 30a).

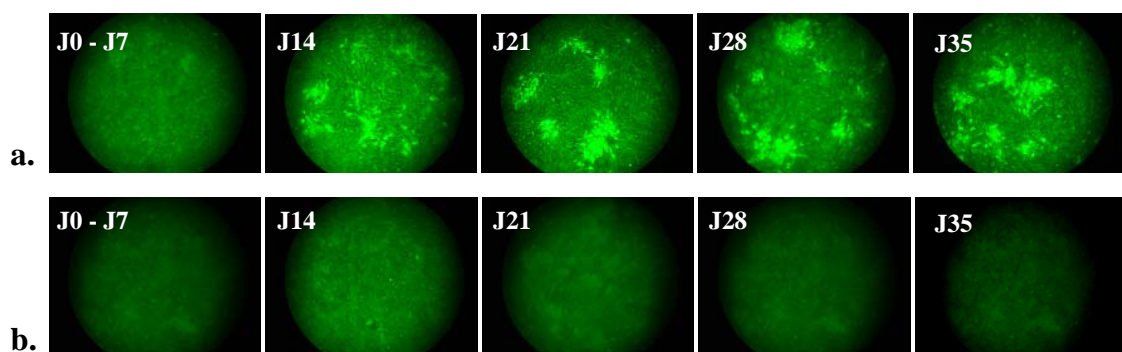


Figure 30 - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence chez les chèvres immunisées avec la souche KS-1. **a.** Chèvres immunisées avec la souche KS-1, **b.** Chèvres témoins

1-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire

Peu ou pas de blastogenèse est observée dans les cupules re-stimulées avec le KS-1. De plus, les marquages cellulaires ainsi que la réponse IFN γ (figure 31) des PBMCs restimulés avec l'antigène total KS-1 (ligne continue verte), présentent des taux comparables au contrôle négatif RPMI (ligne pointillée jaune).

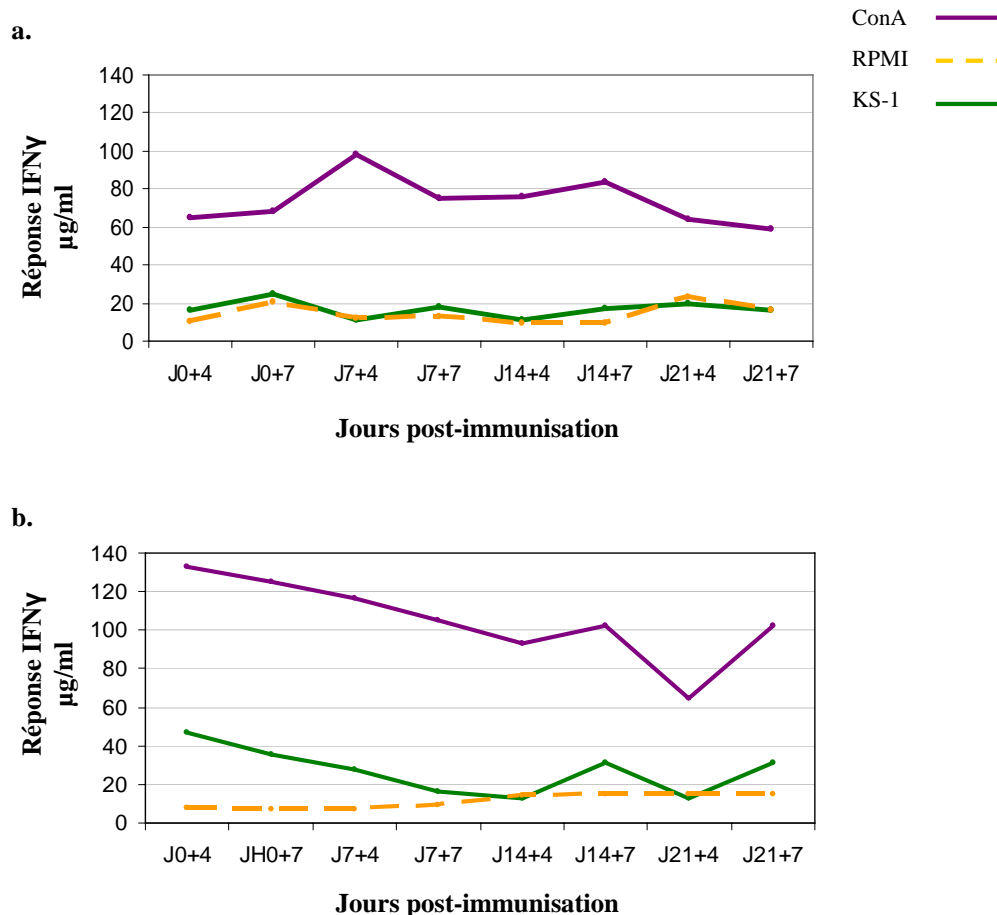


Figure 31 - Evolution de la réponse IFN γ après restimulation avec l'antigène total KS-1. **a.** Chèvres témoins, **b.** Chèvres immunisées avec la souche atténuée KS-1.

Nous supposons que l'antigène KS-1 total provoque un effet inhibiteur sur l'activation des PBMCs. Pour tester cette hypothèse de nouveaux prélèvements sur deux des chèvres immunisées sont effectués. Afin de tester l'effet inhibiteur du KS-1 total sur l'activité mitogène de la ConA, les PBMCs sont restimulés avec un mélange ConA plus KS-1. Après 4 jours de restimulation, on observe une blastogenèse inférieure dans les puits ConA plus KS-1 comparativement aux puits traités avec le mitogène seul. L'effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur l'activité mitogène de la ConA est mesurée au

travers la réponse IFN γ (figure 32) et par cytométrie en flux (figure 33). On constate que toutes les sous-populations lymphocytaires diminuent drastiquement quand le KS-1 est ajouté au mitogène ConA et ceci permet donc de conclure à l'effet inhibiteur du KS-1 (figure 34).

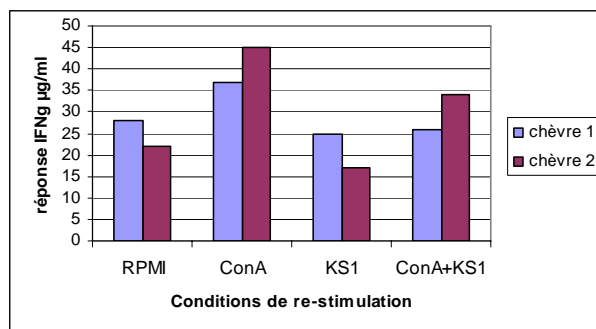


Figure 32 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la réponse IFN γ .

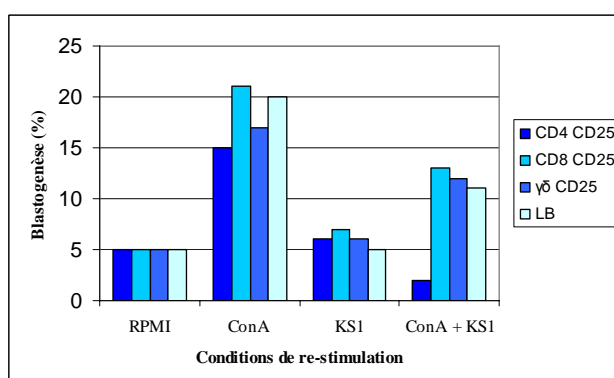


Figure 33 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la lymphoblastogénèse.

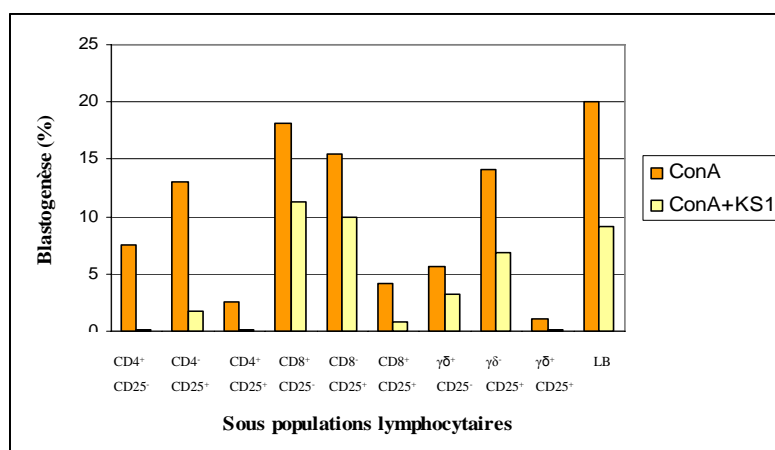


Figure 34 - Effet inhibiteur de l'antigène total KS-1 sur la blastogénèse des différentes sous-populations lymphocytaires.

L'inactivation aux ultraviolets (UV) des surnageants de culture du virus KS-1 permet d'éliminer l'effet inhibiteur de l'antigène sur la prolifération cellulaire. Pour les prochaines restimulations *in vitro* effectuées dans le cadre d'expérimentations animales, une inactivation pendant 30 minutes aux UV (UV Crosslinker, Amersham life Science, USA) des antigènes entiers KS-1 et FCO a été pratiquée.

2 - Immunisation de chèvres et de moutons avec les différentes constructions de poxvirus recombinants FCO

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée: « Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus : Evaluation of immune responses and protection in small ruminants » **Perrin et al.**, 2007 (annexe 2).

2-1 - Matériel et méthodes

2-1-1 - Modèle d'étude

Afin d'évaluer la cinétique de séroconversion, la dynamique des réponses cellulaires et le niveau de protection observés après immunisation avec nos capripoxvirus recombinants pour la FCO, des expérimentations chez la chèvre et le mouton ont été réalisées. La figure 35 présente le calendrier expérimental.

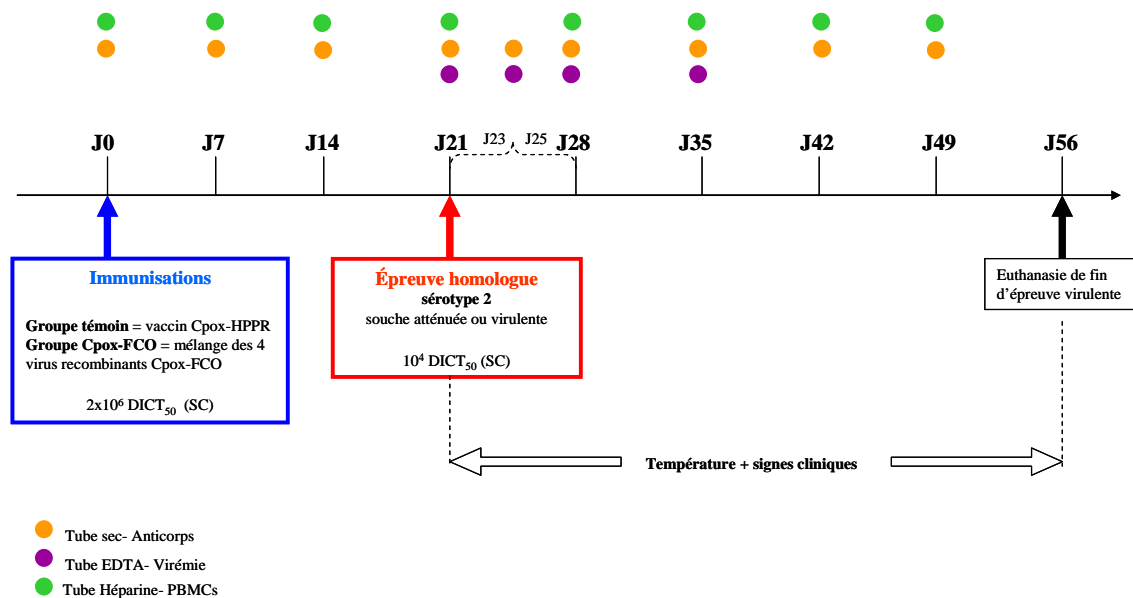


Figure 35 - Calendrier expérimental des essais capripoxvirus recombinants.

2-1-1-1 - Expérimentation sur chèvres

Des chèvres de race Saanen hébergées en animalerie confinement 2 (CIRAD, Montpellier) ont été réparties en deux lots. Un groupe témoin composé de 4 chèvres, a été inoculé par voie sous cutanée avec une dose à 2×10^6 DICT₅₀ avec vaccin capripoxvirus-HPPR, c'est-à-dire exprimant un transgène n'ayant aucun rapport avec le virus de la FCO (HPPR correspond au gène codant pour l'hémagglutinine du virus de la peste des petits ruminants). Le deuxième groupe est composé de 4 chèvres immunisées par voie sous cutané avec un mélange des capripoxvirus recombinants FCO à une dose de 2×10^6 TCID₅₀ chacun (*groupe CpoX-FCO*). Trois semaines après (J21), les chèvres sont éprouvées avec une dose à 10^4 DICT₅₀ de la souche atténuée FCO de sérotype 2. Une chèvre du lot témoin est morte avant les immunisations.

Les chèvres font l'objet d'un prélèvement de sang sur tubes secs, une fois par semaine dès le jour de l'immunisation (J0). Les tubes secs sont mis à décanter à +4°C, puis le sérum est récolté, aliquoté et stocké à -20°C pour recherche d'anticorps. Des prélèvements sur tubes EDTA sont effectués pour recherche virale, le jour de l'épreuve (J21) puis 2, 4 et 7 jours après épreuve (J23, J25 et J28). Enfin, des prélèvements de sang sur tubes héparinés sont effectués hebdomadairement dès le jour de l'immunisation. Le sang est traité pour la récolte des cellules mononuclées qui sont restimulées pendant 4 jours avec du virus entier inactivé (KS-1 et FCO). Le surnageant de culture est prélevé à 4 jours puis stocké à -80°C pour recherche ultérieure d'interféron gamma (IFN γ).

2-1-1-2 - Expérimentation sur moutons

Un pré-essai de vaccination en animalerie confinée niveau 3 (AFSSA, Sophia-Antipolis) avec un vaccin capripoxvirus exprimant le gène de l'hémagglutinine du virus de la peste des petits ruminants (CpoX-HPPR) a permis de valider le modèle d'épreuve virulente, en vérifiant notamment l'absence d'interférence d'une vaccination poxvirus l'incidence clinique d'une épreuve virulente impliquant le virus FCO de sérotype 2. Un deuxième essai sur mouton a été effectué dans le but de tester la protection conférée par les capripoxvirus recombinants. Ainsi, deux lots de 10 et 11 moutons ont été utilisés comme suit : un lot témoin vacciné par voie sous cutanée de 10 moutons, avec une dose de 2×10^6 DICT₅₀ de vaccin capripox-HPPR (*groupe témoin*) et un lot vacciné composé

de 11 moutons inoculés avec un mélange de capripoxvirus recombinants à 2×10^6 DICT₅₀ chacun (*groupe Cpox-FCO*). Trois semaines après immunisation, les animaux sont éprouvés avec une souche virulente du sérotype 2 (J21). La protection est mesurée sur des signes cliniques (absence, présence avec maladie, hyperthermie) et des paramètres virologiques (virémie) du *groupe Cpox-FCO* par rapport au *groupe témoin*.

Des prélèvements pour virologie (sang sur tubes EDTA) sont effectués après épreuve puis à J23, J25 et J28. Les moutons font l'objet d'un prélèvement de sang sur tubes secs pour recherche d'anticorps, le jour de l'immunisation puis tous les 7 jours pendant 5 semaines. Des prélèvements sont également effectués sur tubes héparinés afin d'évaluer les réponses cellulaires, le jour de l'immunisation, trois semaines plus tard, puis 1, 2 et 3 semaines après épreuve.

L'état de santé des animaux est observé quotidiennement. Un score clinique total est affecté à chaque animal en fin d'expérimentation.

2-1-2 - Méthodes

2-1-2-1 - Recherche d'anticorps

La présence d'anticorps anti-NS1/NS3/VP7, anti-VP2, anti-HPPR et anti-Cpox, dans les sérums caprins et ovins est testée par ELISA indirecte, neutralisation virale, ELISA de compétition et immunofluorescence, respectivement.

A - Recherche d'anticorps anti-NS1/NS3/VP7 par ELISA indirecte

Les protéines NS1, NS3 et VP7 exprimées en système Baculovirus (E. Bréard, AFSSA-Lerpaz, Maisons-Alfort), sont diluées au $1/50^{\text{ème}}$ dans du PBS et adsorbées une nuit à 4°C sur des plaques Polysorp 96 puits (Nunc, USA) à raison de 50 µl par puit. Les puits sont ensuite saturés avec du tampon de blocage (PBS-Tween 20 à 0,05%, BSA 1% et lait écrémé 3%). Les sérums caprins et ovins, dilués au $1/100^{\text{ème}}$ dans du tampon de blocage, sont ajoutés en double puis incubés 45 minutes à 37°C. Après quatre lavages en PBS-Tween 20-0,05%, les plaques sont incubées 45 minutes à 37°C avec un anticorps secondaire anti-chèvre marqués à l'Horseradish Peroxydase (HRP) ou anti-mouton-HRP (Dako, USA), selon les sérums à tester. Les anticorps secondaires sont dilués au $1/6000^{\text{ème}}$ dans du tampon de blocage. Après quatre lavages, la réaction

de coloration est activée avec 100 µl de solution substrat (1 mg/ml de O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA), H₂O₂ 0,03%) puis stoppée avec 100 µl d'acide sulfurique 1 M. Les résultats sont exprimés en densité optique (DO) mesurées à une longueur d'onde de 492 nm. Les valeurs de DO sont considérées comme positives lorsqu'elles dépassent la valeur moyenne des DO obtenues à J0 plus 2 écarts-type.

Le test statistique non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les résultats entre les *groupes témoins* et les *groupes Cpx-FCO*. Une probabilité $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

B - Recherche d'anticorps anti-VP2 par neutralisation virale

Les sérums caprins et ovins sont dilués en double, du 1/5^{ème} jusqu'au 1/600^{ème}, puis sont mis en contact avec 100 TCID₅₀ de virus FCO sérotype 2 dans des plaques 96 puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, 100 000 cellules VERO sont ajoutées dans chaque puit et les plaques sont incubées à 37°C, sous 5% de CO₂, pendant 5 à 6 jours. Les résultats obtenus sont exprimés en titre viral et correspondent à l'inverse de la dilution la plus haute donnant 50 % d'ECP. Les sérums avec des titres supérieurs à 10 sont considérés comme positifs.

C - Recherche d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence

Des plaques 96 puits sont préparées à raison de 2 x 10⁴ cellules OA3Ts par puit. Le jour suivant, les cellules à confluence, sont infectées avec le KS-1 avec une dose de 100 TCID₅₀/ml. Le virus est laissé en contact avec les cellules pendant 2 heures à 37°C, 5% CO₂ puis du milieu de culture complet est ajouté. Après 48h d'incubation à 37°C et 5% de CO₂, les cellules sont fixées pendant 30 minutes à -20°C en acétone 80%.

Les cellules sont perméabilisées 30 minutes avec du Triton 100X à 0,2% puis incubées 20 minutes à 37°C avec un tampon de blocage (PBS1X, gélatine 0,2%). Les sérums caprins et ovins sont ajoutés en double à une dilution au 1/50^{ème} (dans du tampon de blocage), pendant 30 minutes à 37°C. Après trois rinçages avec du tampon de blocage des anticorps anti-chèvre-FITC ou anti-mouton-FITC (F0250 et F0135, respectivement - Dako, USA) sont ajoutés au 1/50^{ème} dans du tampon de blocage. Après

trois rinçages en PBS, l'observation de la fluorescence est effectuée au microscope (Nikon, eclipse TE300). Des cellules non infectées servent de témoins négatifs.

D - Recherche d'anticorps anti-HPPR par ELISA de compétition

La présence d'anticorps anti-HPPR est mesurée par un ELISA de compétition suivant la technique décrite par Libeau *et al.*, 1995.

2-1-2-2 - Analyse de la réponse cellulaire

La réponse cellulaire a été évaluée au niveau de la prolifération et de l'activation des lymphocytes après restimulation avec les antigènes totaux inactivés, soit la souche atténuée KS-1, soit et le virus FCO de sérotype 2. En raison de contraintes techniques, l'isolement des PBMCs réalisé à partir des prélèvements correspondants à l'expérimentation faite sur les moutons, n'a pu fournir de résultats exploitables.

Pour l'expérimentation sur chèvres, les cellules mononuclées (PBMCs) sont isolées à partir du sang périphérique dilué au 1/3 sur de l'histopaque 1083 (Sigma, USA). Une partie des cellules blanches est placée directement en restimulation avec les antigènes totaux, KS-1 et FCO (préalablement inactivés aux UV), dans du milieu RPMI (Sigma, USA) enrichi à 10% SBF, 1% L-glu et 1% Atb. L'autre partie des cellules blanches est d'abord marquée avec un traceur cellulaire, le CFSE (CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester – Molecular Probes, USA) afin de suivre la prolifération cellulaire puis mise en restimulation avec les antigènes totaux. Les contrôles négatifs et positifs sont soit du milieu de culture seul, soit du milieu de culture contenant un mitogène, la concanavaline A à 5 µg/ml (ConA, Sigma, USA). Les cellules sont incubées 4 jours en présence ou non des antigènes de restimulation. L'activation et la prolifération des cellules sont évaluées par passage au cytomètre en flux (FACSort, Becton Dickinson) en utilisant les paramètres FSC x SSC et FL1 x FSC.

Les valeurs obtenues pour les *groupes témoins* et *Cpox-FCO* sont comparées par le test statistique de t-Student. Une valeur de probabilité $p < 0.05$ est considérée comme significative.

2-1-2-3 - Evaluation de la protection

A - Recherche virale chez les chèvres et les moutons

Des prélèvements de sang sur EDTA sont effectués le jour de l'épreuve (J21) puis 2, 4 et 7 jours après épreuve (J23, J25 et J28) pour les chèvres et à J21, J25 et J28 pour les moutons.

La détection du virus se fait par RT-PCR directement à partir du sang chez les moutons. En revanche, aucune détection directe par cette méthode n'a été possible chez les chèvres. Nous avons donc inoculé des cellules VERO avec les échantillons sanguins préparés selon la technique de Clavijo *et al.*, 2000, puis réalisé une RT-PCR sur les surnageants de culture récoltés après apparition d'un ECP.

L'ARN est extrait à partir du sang selon la méthode du Trizol décrite dans Toussaint *et al.*, 2007b, alors que l'ARN provenant des surnageants de culture est extrait à l'aide du kit «RNeasy tissue» (Qiagen, USA) selon les instructions du fournisseur. Les ADNc sont synthétisés à partir des ARN à l'aide du kit «first-strand cDNA synthesis» (Amersham Biosciences, UK) selon les instructions du fournisseur. Enfin, le virus est détecté par amplification du gène NS1 à l'aide des amorces 11-31 et 284-265 (Katz *et al.*, 1993). Les réactions de PCR se font dans un volume final de 50 µl réparti de la manière suivante: tampon 10x (Qiagen, USA), 250 µM de chaque dNTP (Eurobio, France), 200 ng de chaque amorce et 2,5 U de Taq polymérase (Qiagen, USA), sous les conditions suivantes : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivie par 30 cycles [94°C, 1 min ; 58°C, 1 min ; 72°C, 1 min] et une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min. Un volume de 10 µl d'ADNc est ajouté à chaque réaction de RT-PCR ainsi que des échantillons sans ADN afin d'exclure toute contamination.

B - Scores cliniques après épreuve virulente chez les moutons

Au cours de l'expérimentation sur moutons éprouvés avec la souche virulente du virus FCO de sérotype 2, des scores cliniques ont été attribués à chacun des animaux. Ces scores correspondent au total de points cumulés pour chaque animal, tout au long de l'expérimentation, rapporté au nombre de jours d'expression clinique. La mortalité n'est pas prise en compte dans ce score clinique. Le détail des scores associés à chaque

signe clinique est donné dans le tableau 8. De plus, la température rectale est mesurée quotidiennement du jour de l'immunisation jusqu'à l'euthanasie.

Les scores cliniques obtenus pour chacun des groupes, *témoin* et *Cpox-FCO* sont comparés en utilisant le test statistique de Kruskal-Wallis. Une valeur de probabilité $p < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

		Score
<u>Comportement général</u>	Bon	0 pt
	Apathie	1 pt
	Prostration	2 pts
	Décubitus	3 pts
<u>Signes cliniques</u>		
<i>Oedèmes</i>	De la face	1 pt
	Du nez	1 pt
	De l'espace intermandibulaire	1 pt
	Des lèvres	1 pt
	De la langue	1 pt
<i>Congestion</i>	Peau ou sabots	4 pts
<i>Difficultés de locomotion</i>	Boiterie	2 pts
	Raideurs	2 pts
<i>Problèmes respiratoires</i>	Jetage nasal léger	1 pt
	Jetage nasal important	2 pts
	Toux	1 pt
<i>Problèmes digestifs</i>		1 pt
<i>Autres</i>	Conjonctivite	1 pt
	Ulcères	1 pt
	Bêlements plaintifs	1 pt
	hypersalivation	1 pt
<u>Mort</u>		20 pts

Tableau 8 - Liste des scores associés à chaque signe clinique induit par la FCO. D'après P. Russo, communication personnelle.

2-2 - Résultats

2-2-1 - Evaluation de la réponse humorale

Afin d'évaluer la cinétique de séroconversion des chèvres et des moutons après immunisation avec un mélange des capripoxvirus recombinants FCO, nous avons récolté le sérum des animaux toutes les semaines.

2-2-1-1 - Détection des anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence

Les anticorps anti-capripoxvirus sont révélés par immunofluorescence. La figure 36 présente les résultats de l'IF **a.** pour les chèvres du groupe CpoX-FCO (immunisées avec les capripoxvirus recombinants FCO) **b.** pour les chèvres du groupe témoin (immunisées avec un vaccin sans rapport avec le vaccin testé, le capripoxvirus-HPPR). Dès J14, soit deux semaines après l'immunisation, les chèvres des deux groupes présentent des anticorps anti-capripoxvirus détectables par IF et ce jusqu'à J35. L'illustration **c.** correspond à une chèvre naïve et l'illustration **d.** est le témoin positif correspondant à un sérum hyper immun. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les sérums ovins.

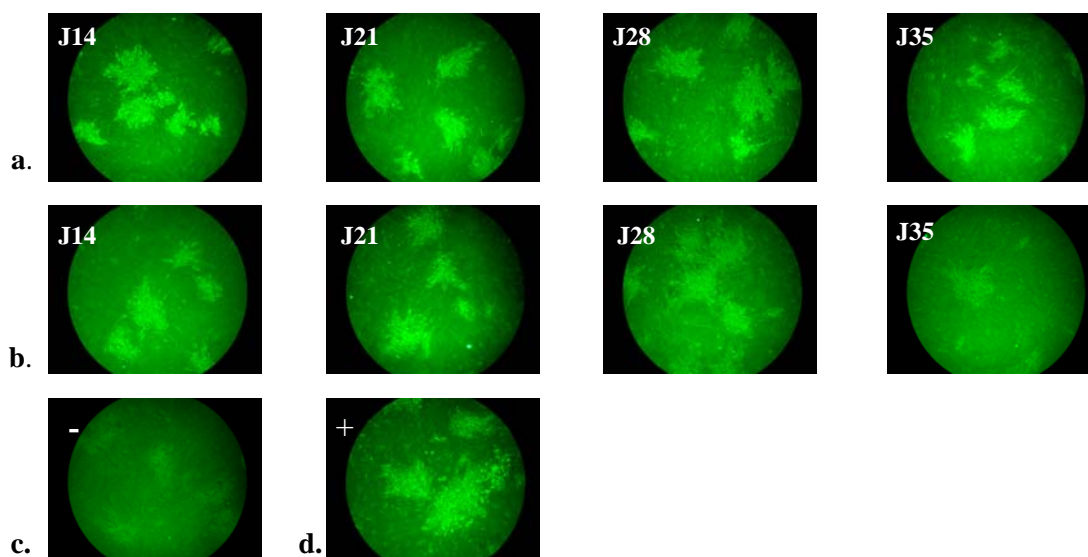


Figure 36 - Détection d'anticorps anti-capripoxvirus par immunofluorescence dans des sérums caprins au cours des essais *in vivo* des capripoxvirus recombinants. **a.** Chèvres du groupe CpoX-FCO, **b.** Chèvres du groupe témoin, **c.** Chèvre naïve, **d.** Témoin positif (sérum hyper immun).

2-2-1-2 - Détection des anticorps anti-HPPR par ELISA de compétition

La figure 37 présente les courbes de séroconversion observées chez les chèvres lors des essais avec les recombinants Cpox-FCO. Comme attendu, les animaux du groupe témoin (courbes roses), immunisés avec le vaccin capripoxvirus-HPPR développent des anticorps anti-HPPR alors que les animaux immunisés avec les capripoxvirus-FCO ne séroconvertissent pas (courbes bleues). Les mêmes résultats ont été obtenus pour les sérums ovins.

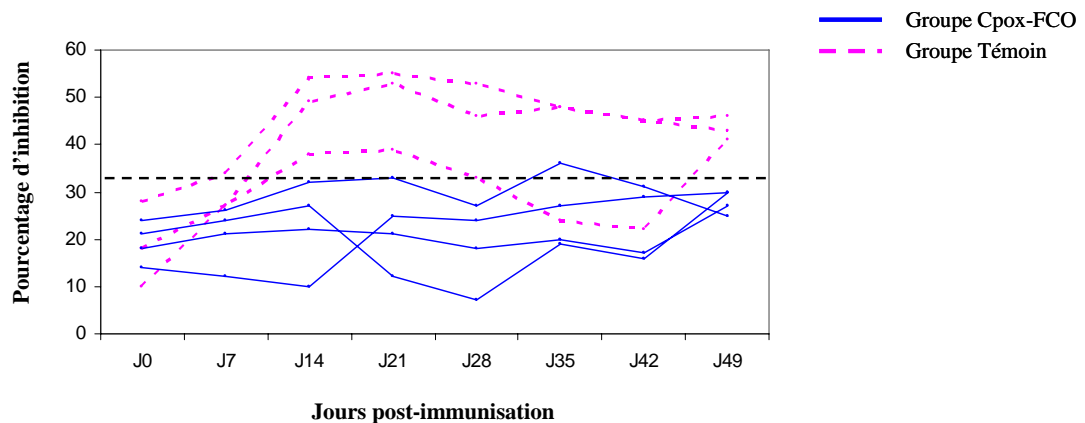


Figure 37 - Réponse anti-HPPR chez les chèvres immunisées avec les recombinants Cpox-FCO et Cpox-HPPR.

2-2-1-3 - Détection des anticorps anti-NS1/NS3/VP7 par ELISA indirect

Trois ELISA différents ont été développés afin d'analyser la réponse anti-NS1, NS3 et VP7. La figure 38 présente les courbes de séroconversion contre l'antigène NS3, obtenues chez les chèvres (a) et chez les moutons (b) immunisés soit avec un mélange de capripoxvirus recombinants FCO (groupe Cpox-FCO) soit un vaccin capripoxvirus sans rapport avec la FCO (groupe témoin). Une séroconversion est observée dans les deux cas dès deux semaines après immunisation (J14) pour 3 chèvres sur 4 et 3 moutons sur 11 dans les groupes Cpox-FCO. A J21, le jour de l'épreuve avec le virus FCO, la quasi-totalité des animaux immunisés avec les vaccins recombinants séroconvertissent. Les animaux du groupe témoin séroconvertissent seulement 2 semaines après l'épreuve (atténuée ou virulente) mais un effet rappel est observé dans le groupe Cpox-FCO à J35. Le test t-student confirme cette différence significative entre les deux groupes ($p < 0,05$).

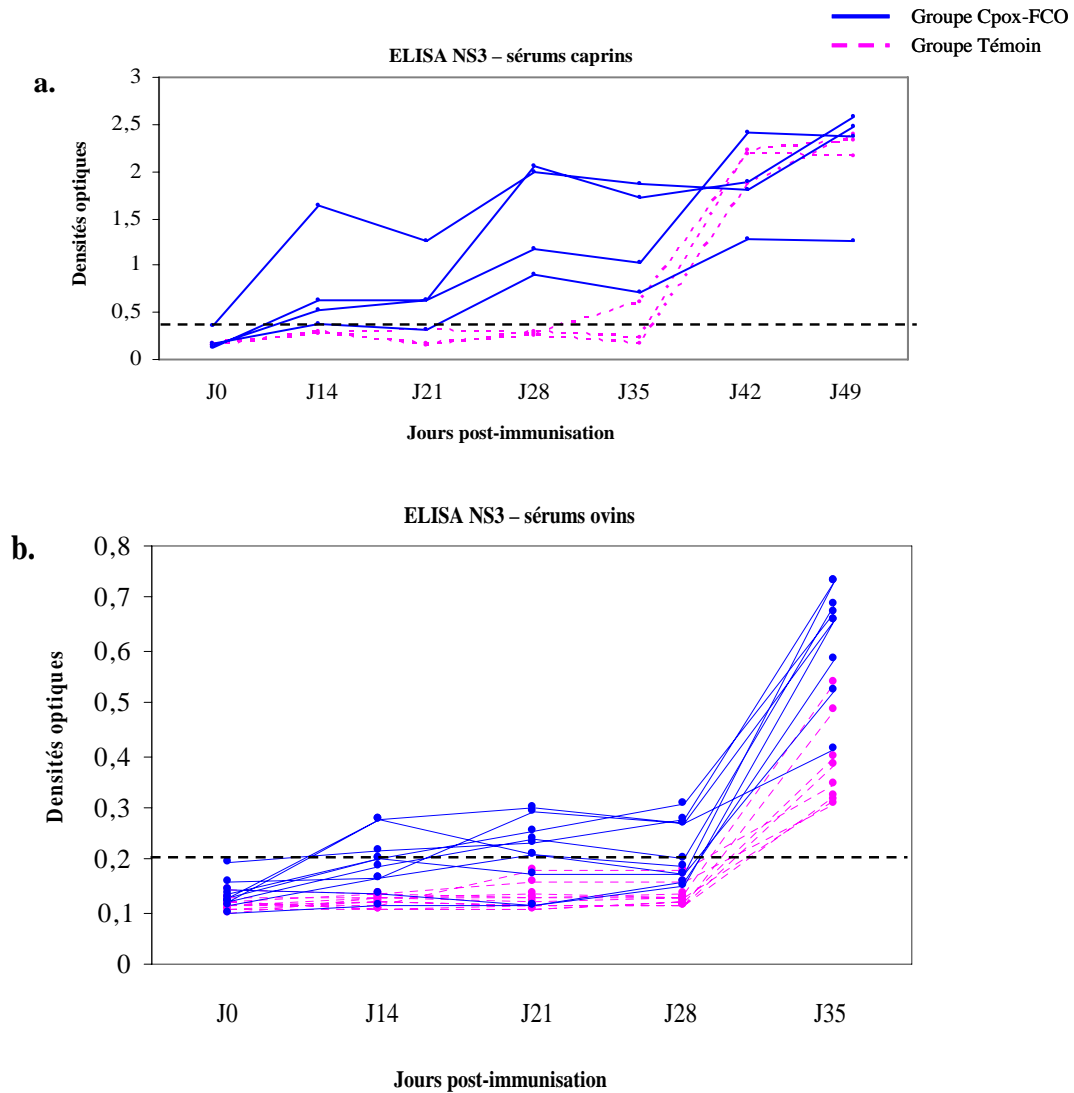


Figure 38 - Réponse anti-NS3 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants. **a.** Expérimentation chèvres, **b.** Expérimentation moutons

La figure 39 présente les courbes de séroconversion concernant l'antigène VP7, obtenues chez les chèvres (a) et chez les moutons (b) du groupe CpoX-FCO ou du groupe témoin. Une séroconversion est observée pour une des chèvres dès deux semaines après immunisation (J14) dans le groupe CpoX-FCO. A J21, 3 moutons sur 11 et seulement 1 chèvre sur 3 ont séroconverti. La quasi-totalité des animaux des groupes témoin et CpoX-FCO séroconvertissent à J35 avec une amplification de la réponse dans les groupes immunisés avec les capripoxvirus recombinants. Les densités optiques obtenues dans les groupes CpoX-FCO sont significativement supérieures à celles observées pour les groupes témoin (t-student, $p < 0.05$).

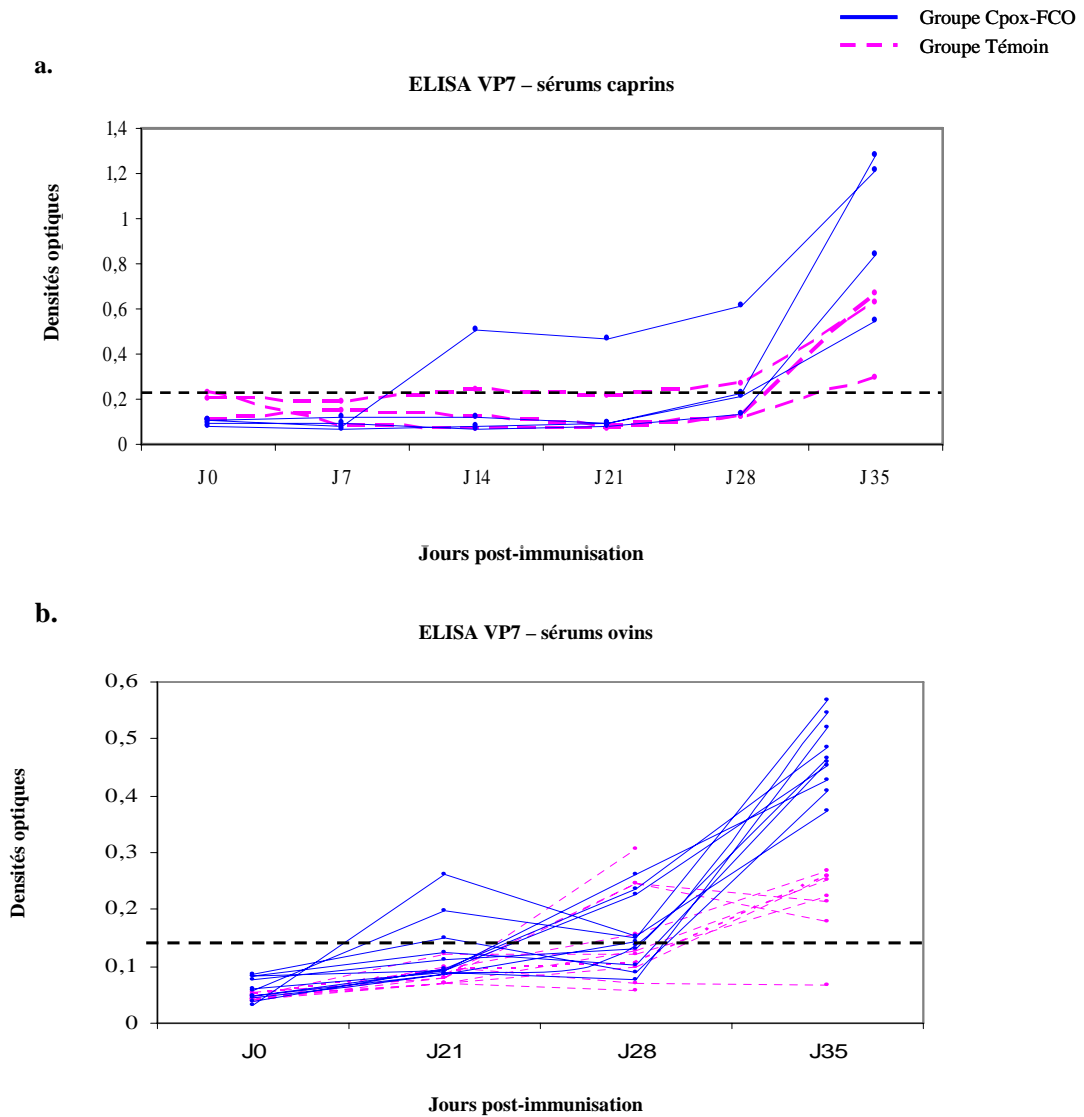


Figure 39 - Réponse anti-VP7 obtenue au cours des essais capripoxvirus recombinants. **a.** Expérimentation chèvres, **b.** Expérimentation moutons.

En raison de difficultés techniques, l'ELISA anti-NS1 n'a pas fourni de résultats exploitables.

2-2-1-3 - Détection des anticorps anti-VP2 par neutralisation virale

Les anticorps anti-VP2 sont détectés par un test de neutralisation virale. Les résultats présentés ici concernent uniquement l'expérimentation sur moutons. Le tableau 9 présente les titres viraux obtenus de J0 (jour de l'immunisation) jusqu'à J35 (2 semaines après épreuve virulente). Des anticorps anti-VP2 sont détectés le jour de

l'épreuve (J21) chez 2 animaux sur 11 dans le groupe Cpox-FCO et dans 6 sur 11 à J28. Trois animaux de plus séroconvertissent 1 semaine plus tard. Les titres viraux obtenus pour le groupe CPox-FCO sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin à J21, J28 et J35 (test Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

	J0	J21	J28	J35
Groupe Cpox-FCO	-	-	-	240
	-	-	15	>640
	-	-	-	Morte
	-	-	-	640
	-	-	20	>640
	-	15	15	>640
	-	-	-	-
	-	-	10	>640
	-	-	-	>640
	-	80	60	>640
Groupe Témoin	-	-	10	>640
	-	-	-	80
	-	-	-	480
	-	-	-	>640
	-	-	-	320
	-	-	-	>640
	-	-	-	Morte
	-	-	15	>640
	-	-	15	Morte
	-	-	10	>640
	-	-	-	-

Tableau 9 - Titres viraux obtenus par neutralisation virale chez les moutons immunisés par les capripoxvirus recombinant FCO.

2-2-2 - Evaluation de la réponse cellulaire chez les chèvres

La prolifération et l'activation des cellules mononuclées récoltées à partir du sang périphérique sont analysées hebdomadairement du jour de l'immunisation jusqu'à la fin de l'expérimentation.

2-2-2-1 - Lymphoprolifération

La prolifération des lymphocytes restimulés avec les antigènes entiers et inactivés est évaluée après marquage au CFSE et passage au cytomètre en flux. La figure 40a présente les résultats de prolifération observés après restimulation avec le virus de la FCO. Une prolifération spécifique est observée dès J14, soit deux semaines

après immunisation dans le groupe CpoX-FCO (barres d'histogramme bleues) puis à J28 de manière plus significative et enfin à J35. Comme attendu, aucune prolifération significative n'est observée pour le groupe témoin (barres d'histogramme violettes). La figure 40b présente les résultats de prolifération observée après restimulation avec le capripoxvirus, KS-1. Une prolifération spécifique est observée dès J7, soit une semaine après l'immunisation dans le groupe CpoX-FCO et à J14 pour les deux groupes témoin (CpoX-HPPR) et CpoX-FCO. L'intensité de prolifération augmente rapidement pour le groupe CpoX-FCO jusqu'à atteindre son maximum à J28. En revanche, pour le groupe témoin (CpoX-HPPR) la prolifération est nettement moins augmentée que dans le groupe CpoX-FCO. Les pourcentages obtenus pour le groupe CpoX-FCO sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour le groupe témoin à J14, J28 et J35 (test student, $p < 0,05$).

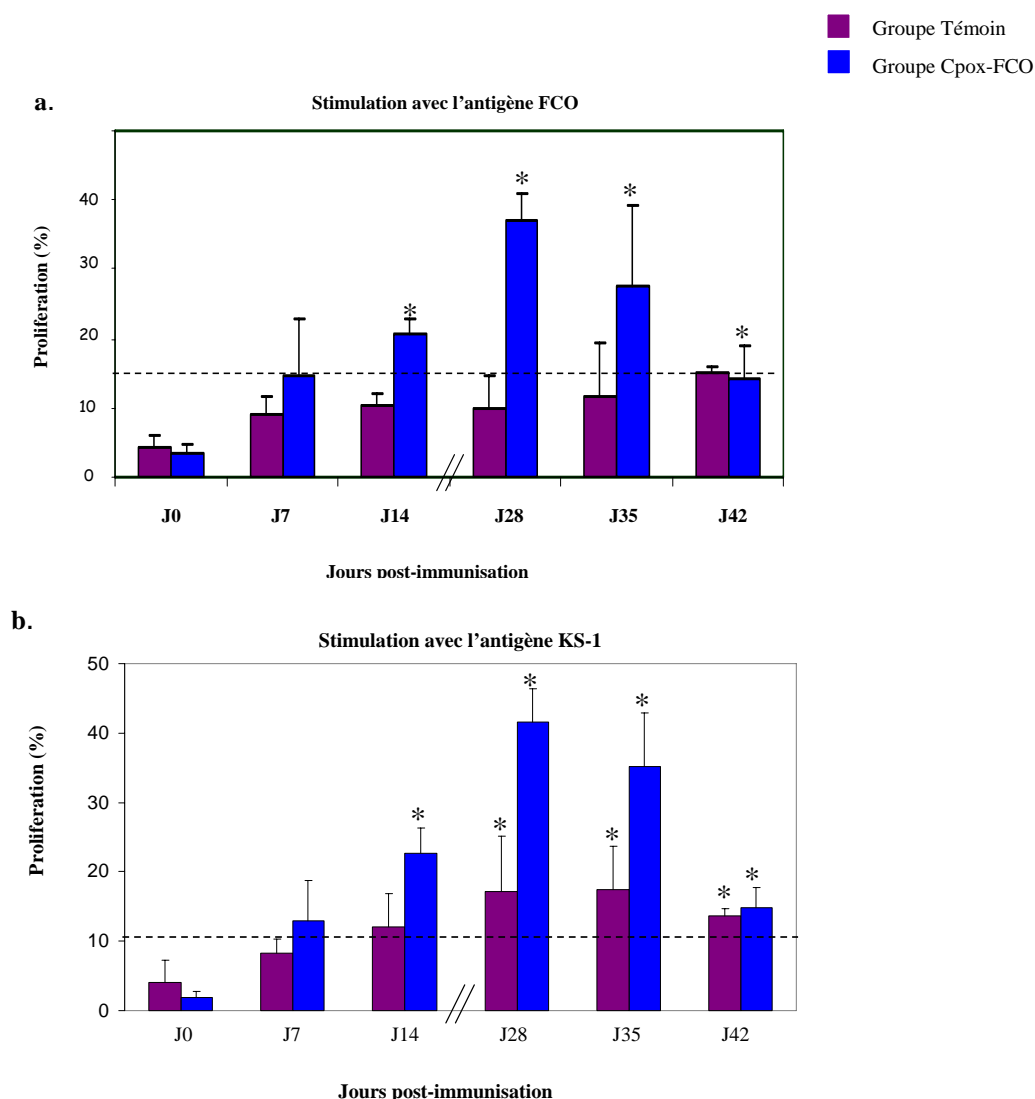


Figure 40 - Prolifération des lymphocytes après restimulation avec les antigènes FCO (a) et KS-1(b).

2-2-2-2 - Lymphoblastogenèse

L'activation ou blastogenèse des lymphocytes restimulés avec les antigènes entiers et inactivés est évaluée après passage au cytomètre en flux. La figure 41a présente les résultats de blastogenèse observés après restimulation avec le virus de la FCO. Une activation spécifique est observée à J28, soit une semaine après l'épreuve FCO dans le groupe Cpox-FCO puis décroît rapidement jusqu'à J35. Aucune activation significative est observée pour le groupe témoin. La figure 41b présente les résultats d'activation observée après restimulation avec le capripoxvirus KS-1. Une activation spécifique est observée dès J7 et jusqu'à J42 dans le groupe Cpox-FCO et seulement à J14, J28 et J42 pour le groupe témoin.

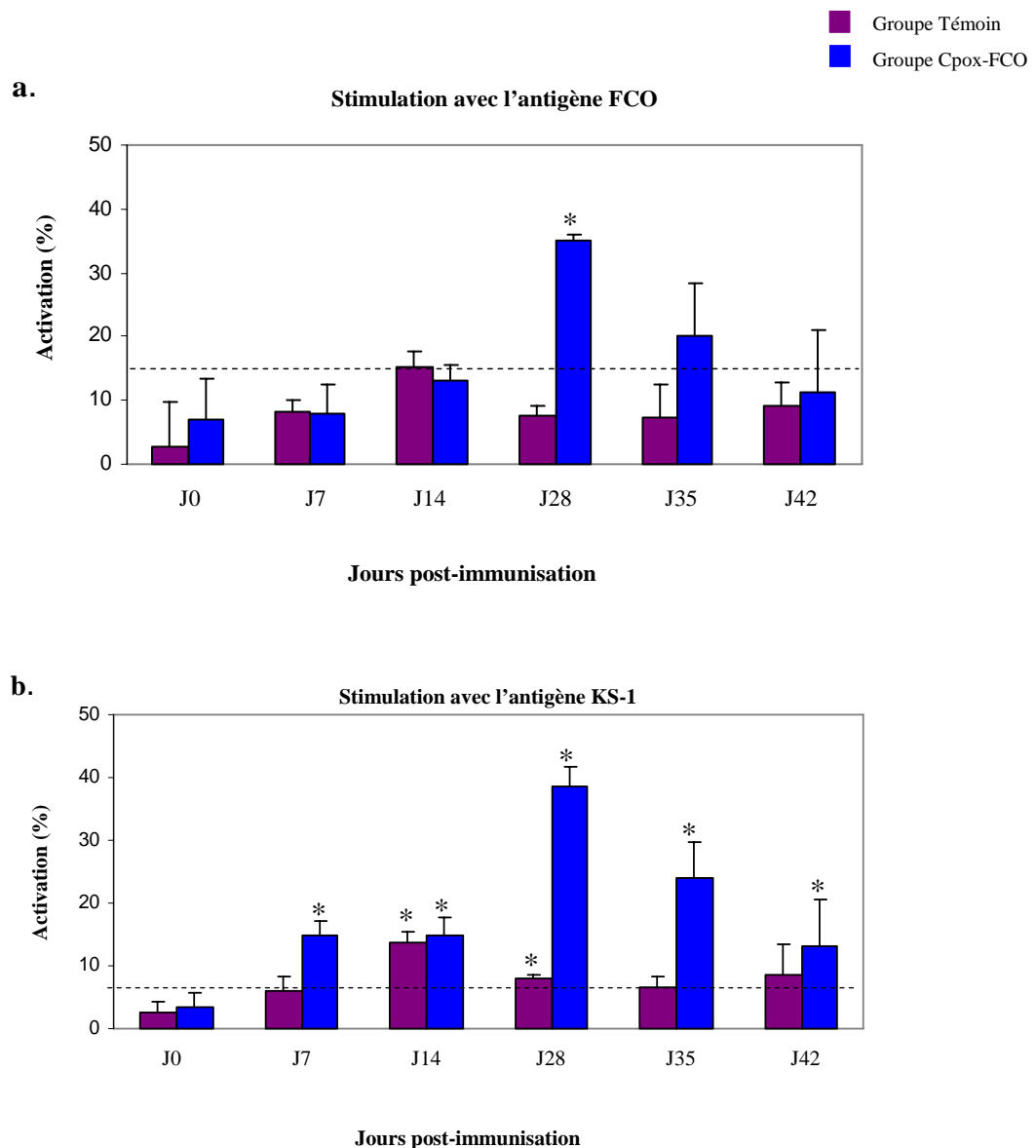


Figure 41 - Activation des lymphocytes après restimulation avec les antigènes FCO (a) et KS-1 (b).

2-2-3 - Evaluation de la protection

La capacité des capripoxvirus recombinants FCO à protéger les chèvres et les moutons contre la maladie et contre une réplication du virus est évaluée après épreuve virulente par l'observation des signes cliniques après épreuve virulente chez les moutons, et par la détection du virus de la FCO dans le sang.

2-2-3-1 - Virémie

La détection du génome du virus de la FCO a été réalisée le jour de l'épreuve (J21) puis à J23, J25 et J28 chez les chèvres. Le virus n'étant pas détectable directement dans le sang, un passage en culture sur cellules VERO a été nécessaire. Le tableau 10 présente les résultats de détection du virus FCO dans le sang des chèvres éprouvées avec une souche atténuée. Les animaux du groupe témoin présentent du virus dès 2 jours après l'épreuve, alors qu'aucune amplification du virus n'est détectable pour les animaux du groupe Cpox-FCO.

Chèvres		Jours post-immunisation			
		J21	J23	J25	J28
Groupe témoin	# 1	-	+	+	+
	# 2	-	+	+	+
	# 3	-	+	+	+
Groupe Cpox-FCO	# 4	-	-	-	-
	# 5	-	-	-	-
	# 6	-	-	-	-
	# 7	-	-	-	-

Tableau 10 - Suivi de la virémie dans le sang des chèvres lors des essais capripoxvirus recombinants.

La détection du génome du virus de la FCO a été réalisée le jour de l'épreuve (J21) puis à J25 et J28 chez les moutons. Le tableau 11 présente les résultats de détection du virus FCO dans le sang des moutons éprouvés avec une souche virulente. La quasi-totalité des animaux du groupe témoin (9/10) présentent du virus à J25 alors que seulement 6 animaux du groupe Cpox-FCO sur 11 présentent du virus. A J28, soit 1 semaine après épreuve, tous les animaux du groupe témoin sont positifs en détection

virale alors que 3 animaux du groupe Cpox-FCO ne présentent toujours pas de charge virale.

Moutons		Jours post-immunisation		
		J21	J25	J28
Groupe témoin	# 1	-	-	+
	# 2	-	+	+
	# 3	-	+	+
	# 4	-	+	+
	# 5	-	+	+
	# 6	-	+	+
	# 7	-	+	+
	# 8	-	+	+
	# 9	-	+	+
	# 10	-	+	+
Groupe Cpox-FCO	# 11	-	-	-
	# 12	-	-	+
	# 13	-	+	+
	# 14	-	+	+
	# 15	-	-	+
	# 16	-	+	+
	# 17	-	+	+
	# 18	-	-	+
	# 19	-	+	-
	# 20	-	-	+
	# 21	-	+	-

Tableau 11 - Suivi de la virémie dans le sang des moutons lors des essais capripoxvirus recombinants.

2-2-3-2 - Pathologie et scores cliniques

Un animal du groupe Cpox-FCO est mort à J55. Des lésions au niveau de la cavité buccale, des muqueuses et des poumons ont été observées lors de l'euthanasie. Ces symptômes sont caractéristiques d'une infection due au virus de la FCO. Deux moutons du même groupe n'ont présenté aucun symptôme de la maladie. En revanche, tous les autres animaux ont présenté des signes cliniques plus ou moins marqués et des troubles du comportement au cours de l'expérimentation (figure 42). Dix animaux sur onze du groupe Cpox-FCO n'a présenté aucune lésion lors de l'examen post-mortem en fin d'expérimentation.

Dans le groupe témoin, 3 animaux sont morts à J53, J54 et J58, des suites d'hémorragies relativement importantes, observées au niveau de la cavité buccale et/ou thoracique. Tous les autres animaux de ce groupe ont présenté des signes cliniques et

des troubles du comportement (figure 42). Lors de l'examen post-mortem en fin d'expérimentation, des lésions modérées de la cavité buccale ou des muqueuses ont été observées chez certains animaux (4/10).



Figure 42 - Symptômes observés chez les moutons au cours des essais capripoxvirus recombinants. **a.** Larmoiement, **b.** Apathie et trouble locomoteur, **c.** Jetage.

La figure 43 présente les scores cliniques attribués à chaque animal correspondant à la totalité des points obtenus, n'incluant pas la mortalité, au cours de l'expérimentation ramenée au nombre de jours d'expression clinique. Il apparaît une nette différence entre les deux groupes confortée par le test statistique de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). En effet, 2 animaux sur 11 du groupe Cpox-FCO (barres d'histogramme bleues) ne présentent aucun signe clinique et 4 autres présentent des scores inférieurs à 3 points. En revanche, les animaux du groupe témoin (barres d'histogramme violettes) ont des scores supérieurs à 5 points pour la majorité d'entre eux (6/10).

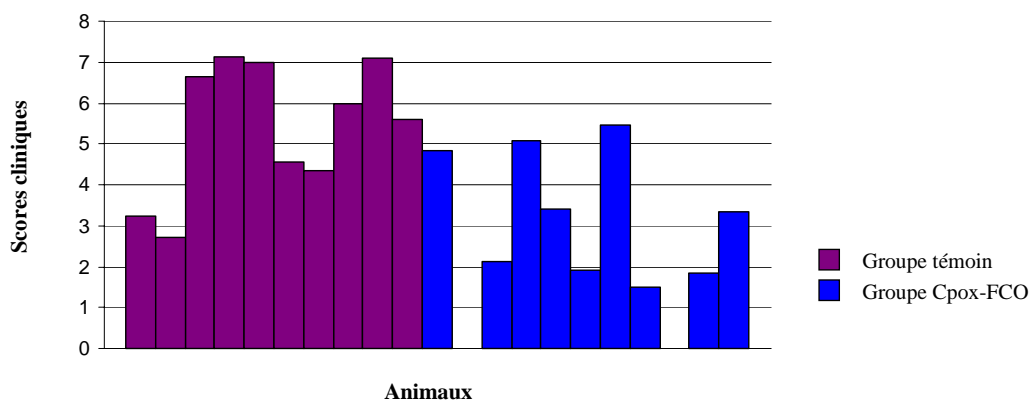


Figure 43 - Scores cliniques obtenus chez les moutons après épreuve virulente homologe. L'absence de barre symbolise les animaux n'ayant présenté aucun signe clinique.

La figure 44 présente les courbes de moyenne de température obtenues chez les moutons du groupe témoin (courbe rose) et du groupe Cpox-FCO (courbe bleue). Une température supérieure à 40°C est généralement considérée comme signe d'hyperthermie. Le profil général des courbes de température est semblable quelque soit le groupe considéré. Cependant, à J+4, soit 3 jours après immunisation, les animaux du groupe Cpox-FCO présentent un pic de température proche de 40,5°C. On observe le même phénomène, après l'épreuve virulente avec une température moyenne à 40°C. En revanche, on observe pour les deux groupes, témoin et Cpox-FCO, une hyperthermie proche de 41,5°C, 1 semaine après l'épreuve virulente.

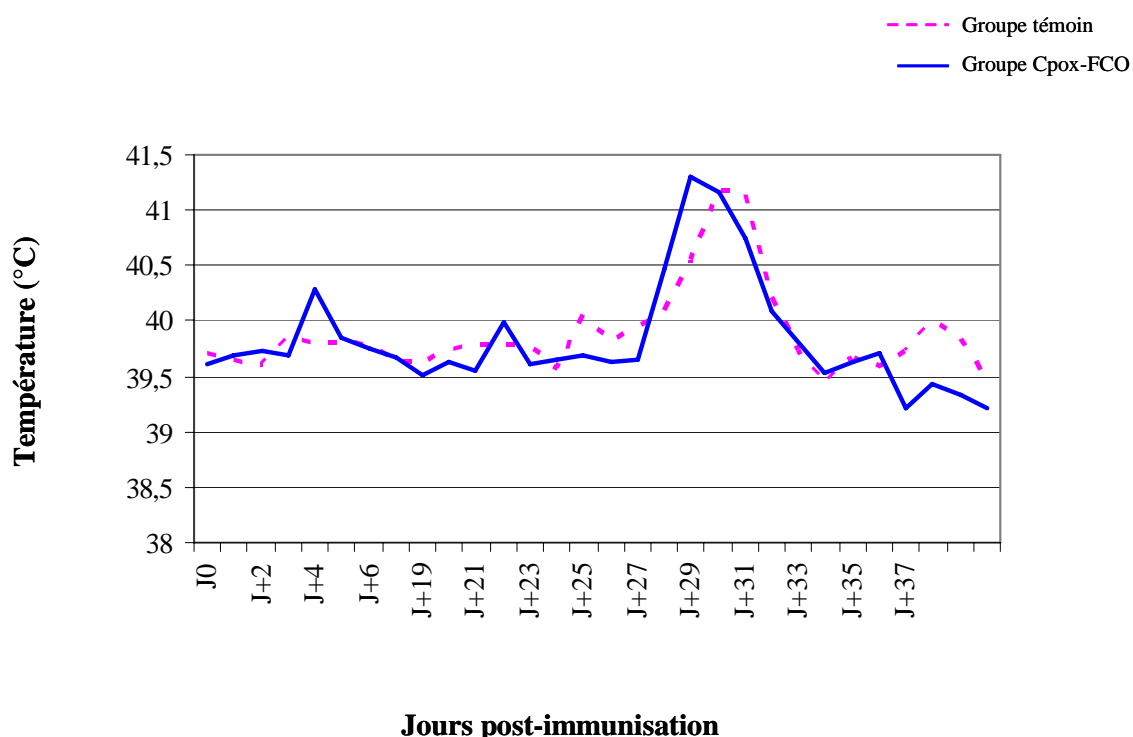


Figure 44 - Courbes de température rectales observées chez les moutons au cours de l'expérimentation Cpox-FCO.

2-3 - Conclusion

Une séroconversion anti-NS3 et anti-VP7 est observée à la fois chez des chèvres et chez des moutons 2 semaines avant épreuve FCO. Une séroconversion anti-VP2 est également observée chez des moutons, le jour de l'épreuve. De plus, on observe un effet rappel, dû à l'épreuve (J35), chez tous les animaux de groupe Cpox-FCO. Les animaux développent également des anticorps anti-capripoxvirus (groupes témoin et groupes

Cpox-FCO). Ceci démontre la capacité des vaccins capripoxvirus exprimant différents gènes du virus de la FCO à générer des anticorps à la fois contre le vecteur mais aussi contre les transgènes.

L'activation et la prolifération spécifiques des PBMCs caprins après restimulation avec les antigènes FCO et KS-1 entiers inactivés confirment l'immunogénicité des capripoxvirus recombinants FCO délivrés aux animaux.

L'effet protecteur des vaccins capripoxvirus-FCO a été évalué chez les moutons après épreuve virulente. Seule une protection partielle a été obtenue. En effet, certains animaux ont développé des signes cliniques et un animal est mort au cours de l'expérimentation. Cependant, nous observons une différence significative entre le groupe témoin et le groupe Cpox-FCO en ce qui concerne les scores cliniques et la virémie après épreuve virulente. Par ailleurs, l'administration des capripoxvirus chez la chèvre a complètement inhibé la réplication du virus FCO atténué, confirmant l'immunogénicité des recombinants générés. Cette immunogénicité est suffisante pour contrôler la réplication d'un virus atténué mais pas celle d'un virus non atténué, ce qui explique l'incidence clinique résiduelle observée chez les moutons ayant reçu nos capripoxvirus recombinants. Compte tenu de ces résultats, nous avons abandonné provisoirement la possibilité de protéger des animaux contre un sérotype FCO hétérologue. Nous nous sommes plutôt interrogés sur les possibilités d'amélioration de la réponse immunitaire induite par nos capripoxvirus recombinant. Une piste a été explorée plus en détail et fait l'objet d'une description dans le chapitre suivant.

Chapitre 5 - Amélioration du système vaccinal et validation *in vitro*

Des études récentes ont montré la capacité de vecteurs canarypoxvirus, co-exprimant les deux protéines de la capside externe du virus de la FCO, VP2 et VP5, à générer une protection totale chez des moutons après une épreuve virulente de type homologue (Boone *et al.*, 2007) alors que les deux protéines non associées induisent au mieux une protection partielle (Roy *et al.*, 1990b ; Lobato *et al.*, 1997). Il semble que l'expression d'une pseudo-capside virale composée de VP2-VP5 améliore l'immunogénicité *in vivo*. Pour tirer bénéfice de cette approche tout en gardant l'objectif initial d'induire une protection contre plusieurs sérotypes, nous avons décidé de développer une nouvelle approche vaccinale basée sur la production d'un poxvirus recombinant co-exprimant les deux protéines conservées de la capside interne du virus de la FCO, les protéines VP3 et VP7. L'intérêt de cette approche est la reconstitution d'une pseudo particule virale, non spécifique du sérotype, supposée plus immunogène que les protéines individuelles. Son immunogénicité pourra être évaluée dans une stratégie vaccinale de type hétérologue.

1 - Matériel et Méthodes

1-1 - Construction du nouveau plasmide de transfert

Pour la construction du vecteur de transfert co-exprimant les deux gènes VP3 et VP7, le même principe utilisé pour le développement des simples recombinants a été suivi.

Au sein d'une particule virale, il y a environ 7 fois plus de molécules VP7 que de VP3, à savoir 780 molécules de VP7 par virion pour 120 molécules de VP3 (Huisman & Vandisjk, 1990). Afin de respecter ce ratio, il est nécessaire de placer le gène codant pour la protéine VP7, sous un promoteur plus fort que le promoteur synthétique qui est placé en amont du gène VP3. Le choix s'est porté sur un analogue chez le capripoxvirus du promoteur pIL1 du virus de la vaccine (Liu *et al.*, 2004). Ce promoteur a une capacité d'expression 6 à 10 fois plus élevée que les autres promoteurs utilisés classiquement (pS,

p7.5, ATI...). En outre, c'est un promoteur d'expression intermédiaire à tardive (C. Le Goff, communication personnelle).

Dans un premier temps, l'ADNc correspondant à l'intégralité du gène VP3 a été cloné dans un plasmide pSCB (Stratagène, USA) puis sous-cloné dans le plasmide de transfert pKSCATpSGPT au niveau du site de restriction *EcoRI*. D'autre part, des amorces nommées, Not1-pIL1-VP7-F et VP7-Spe1-R, (annexe 1) ont été spécifiquement synthétisées afin d'amplifier la totalité du gène VP7 avec le promoteur pIL1 et les sites de restriction *SpeI* / *NotI* ajoutés en queue flottante (figure 45).

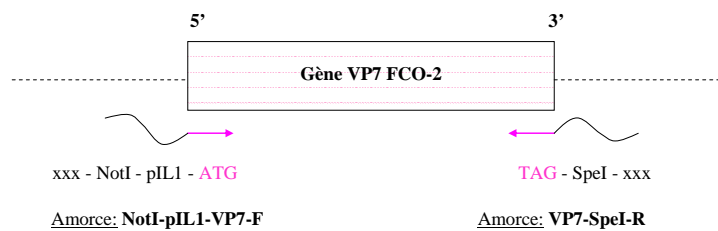


Figure 45 - Représentation schématique du principe d'amplification du gène VP7 par PCR avec le promoteur pIL1 et les sites de restriction *SpeI*/*NotI*, en queue flottante.

Finalement, le gène VP7 et son promoteur sont sous-clonés au sein du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP3 (figure 46) préalablement digéré au niveau du site de clonage multiple (*NotI* / *SpeI*). Le gène *Ecogpt* est utilisé comme marqueur de sélection et la TK comme site d'insertion. Le plasmide est amplifié dans des bactéries *Stbl3* chimio-compétentes (Stratagène, USA) puis purifié avec le kit Endofree plasmid maxi (Qiagen, USA). Un séquençage de vérification a été effectué sur le plasmide.

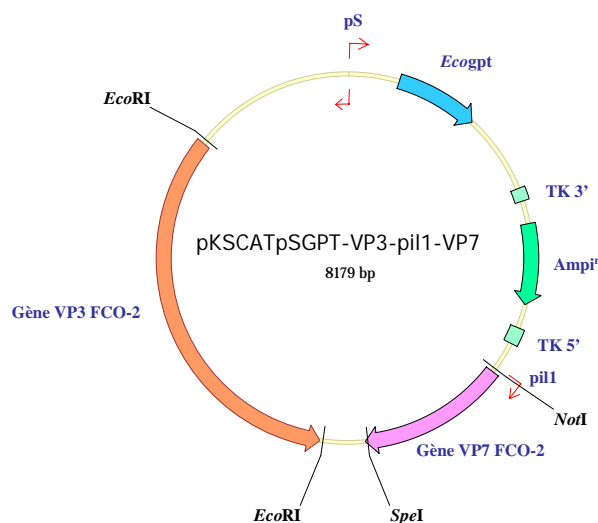


Figure 46 - Carte de restriction du plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7.

1-2 - Validation fonctionnelle de la construction par expression transitoire

La construction est testée afin d'évaluer le niveau d'expression des deux gènes d'intérêt introduits. La validation *in vitro* de l'expression de chacun des gènes s'est faite de deux façons, soit par immunofluorescence pour le gène VP7 soit par la mise en évidence de la production d'ARNm pour les deux gènes VP3 et VP7. Pour ce faire, nous avons suivi le même protocole que celui utilisé pour les constructions précédentes (cf chapitre 1, paragraphe 1-3-1). Brièvement, des cellules OA3Ts sont infectées avec la souche atténuée KS-1 (MOI=1) puis transfectées avec le plasmide de transfert pKSCATPSGPT-VP3-pil1-VP7. Après 72h d'infection à 37°C et 5% CO₂, les cellules sont visualisées au microscope à fluorescence afin d'évaluer l'efficacité de la transfection grâce au contrôle pEGFP. Une partie des cellules est fixée pour la réalisation de l'immunofluorescence et l'autre partie est récoltée pour permettre une extraction d'ARNm.

Afin de valider l'expression du gène VP7, l'immunofluorescence a été réalisée selon le même protocole que lors des précédentes expérimentations. L'observation de la fluorescence est effectuée par microscopie (Nikon, eclipse TE300). En l'absence d'anticorps VP3, l'expression de la protéine n'a pas pu être vérifiée par immunofluorescence.

Les ARNm sont extraits à partir des cellules selon le même protocole utilisé pour les capripoxvirus simples recombinants. Une première amplification par PCR est réalisée sur les ADNc à l'aide d'amorces spécifiques du gène de la β -actine (β -act1 / β -act2, Annexe 1) afin de vérifier l'intégrité et la qualité des ARNm extraits. Une deuxième PCR avec des amorces spécifiques des gènes (VP7 F1/R1, VP3 F1/R1, Annexe 1) est réalisée, sur les ADNc et sur les ARNm initiaux afin de vérifier qu'il n'y ait pas de contamination résiduelle par de l'ADN plasmidique. Les réactions de PCR se font dans un volume total de 50 μ l réparti de la manière suivante : tampon 10x, 250 μ M de chaque dNTP (Eurobio, France), 200 ng de chaque amorce, 2.5 U de Taq polymérase, 5 μ l d'ADNc ou 1 μ l d'ARNm. Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 12.

Gènes	Amorces	Conditions d'amplification	tailles des amplicons (pb)
β-Actine	β-Act-1 / β-Act-2	95°C / 3 min, 40 x [95°C / 30 sec, 55°C / 30 sec, 72°C / 30 sec], 72°C / 7min	263 pb
VP3 BTV-2	VP3-F1 / VP3-R1	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 50°C / 1 min, 72°C / 1'30 min], 72°C / 7min	1401 pb
VP7 BTV-2	VP7-F1 / VP7-R1	95°C / 3 min, 30 x [95°C / 1 min, 55°C / 1 min, 72°C / 1 min], 72°C / 7min	1050 pb

Tableau 12 - Liste des amorces et conditions d'amplification utilisées lors de l'expression *in vitro* du capripoxvirus double recombinant FCO.

1-3 - Observations en microscopie électronique en transmission

Les produits d'expression *in vitro* sont également visualisés en microscopie électronique en transmission (MET) afin d'observer l'éventuelle reconstitution d'une pseudo-particule virale. Cette manipulation a été effectuée au CIRAD, UMR BGPI par Daniel Gargani.

Les cellules centrifugées sont fixées 2 heures à 4°C dans un mélange de glutaraldéhyde 0,2%, paraformaldéhyde 2% dans un tampon de cacodylate de sodium (0,1 M – pH 7,2). Après deux rinçages dans la solution tampon, les cellules sont déshydratées suivant un gradient d'éthanol de 50 %, 70% puis 90%. L'étape suivante est l'imprégnation puis l'inclusion des cellules dans une résine LR Gold, une nuit à -20°C sous UV (360 nm). Une fois la polymérisation effectuée, des coupes de 60 à 80 nm d'épaisseur sont effectuées à partir des blocs de résine, puis déposées sur des grilles de nickel d'une maille de 150 (150-mesh).

Afin de visualiser l'expression de la protéine VP7, un immuno-marquage a été effectué sur les coupes. Ces dernières sont incubées dans du tampon de blocage (Tris-HCl 0,1 M ; NaCl 0,85% ; Tween 20 0,1%, BSA 1% ; pH 7,4) pendant 30 minutes. Les anticorps primaires anti-VP7, dilués au 1/100^{ème} dans du tampon de rinçage (Tris-HCl 0,1 M ; NaCl 0,85% ; Tween 20 0,1%, BSA 0,01% ; pH 7,4), sont mis en contact pendant 1 heure. Après un rinçage dans le même tampon, les anticorps secondaires EM GAR IgG 10nm (BBI, USA) sont incubés pendant 1 heure puis éliminer avec un dernier rinçage.

Les coupes sont contrastées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle et citrate de plomb puis observées au microscope électronique en transmission (JEOL 100CX) à 80 KV.

2 - Résultats

2-1 - Vérification de la construction plasmidique

Après amplification avec le lot d'amorces (VP3-F1 / VP3-R2), le gène VP3 est inséré dans le plasmide pKSCATpSGPT dans le site de restriction EcoRI. La figure 47 présente le criblage des colonies bactériennes par PCR à l'aide d'amorces internes au gène (VP3-F1 / VP3-R1). Pour chacun des clones choisis (1 à 13) nous obtenons une bande spécifique à 1401 pb.

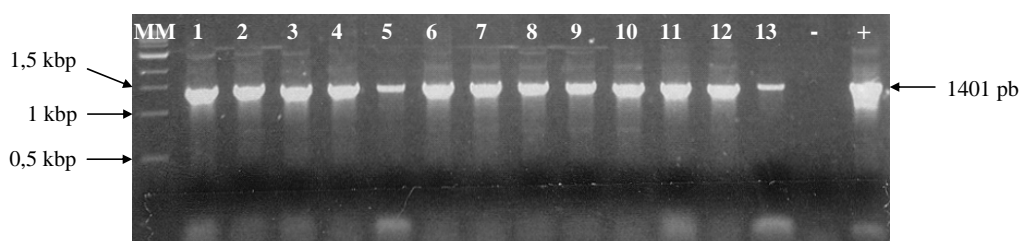
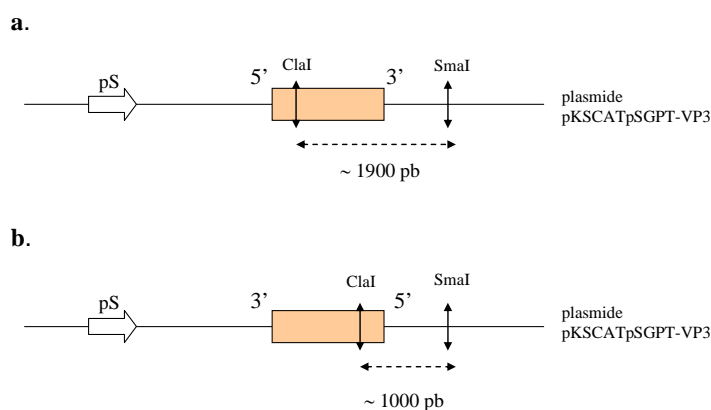


Figure 47 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du pKSCATpSGPT-VP3. MM : Marqueur de poids moléculaire, 1 à 13 : colonies bactériennes, - : témoin négatif, + : témoin positif.

L'insertion du gène VP3 s'est fait dans un site unique (EcoRI), il est donc nécessaire d'en vérifier l'orientation. Pour ce faire, une digestion enzymatique avec les enzymes ClaI et SmaI sur 8 clones (colonies 1 à 8) amplifiés par mini-préparation a été réalisée. Des fragments de restrictions de deux tailles différentes peuvent être attendus, en fonction du sens d'orientation du gène VP3 inséré. En effet, si le fragment a été inséré dans le sens attendu (figure 48a) nous devrions obtenir un fragment de restriction d'environ 1900 pb. Dans le cas contraire (figure 48b) nous obtenons un d'environ 1000 pb.



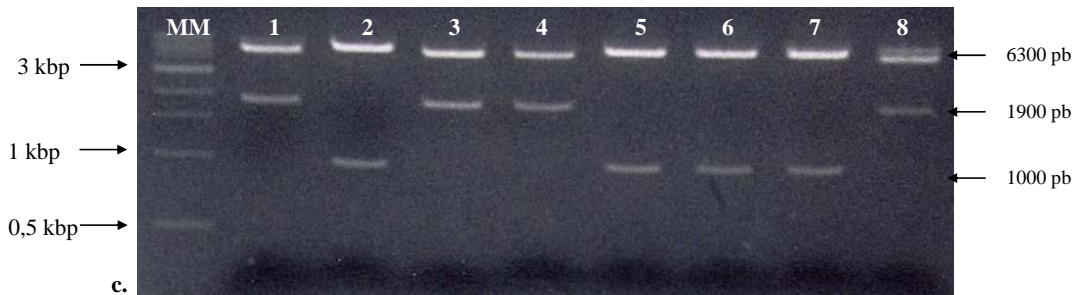


Figure 48 – a. et b. : schéma théoriques du profil de digestion c. Double digestion enzymatique ClaI/SmaI de différentes mini-préparations du pKSCATpSGPT-VP3. MM : Marqueur de poids moléculaire, 1 à 8 : mini-préparations.

Quatre des huit clones choisis présentent le profil correct (clone 1, 3, 4 et 8). Le clone 1 a été choisi pour la suite de la construction du capripoxvirus double recombinant.

La deuxième étape repose sur l'amplification puis l'insertion du gène de la VP7 avec son promoteur pIL1 au sein du plasmide pKSCATpSGPT-VP3 au niveau des sites de restriction SpeI, NotI. La figure 49 présente le criblage des colonies obtenues après ligation et transformation du plasmide pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7 en bactéries. Pour chacun des 8 clones sélectionnés, nous obtenons une bande spécifique à 1401 pb et une bande spécifique à 1050 pb correspondant respectivement à une partie du gène VP3 et au gène VP7 du virus de la FCO.

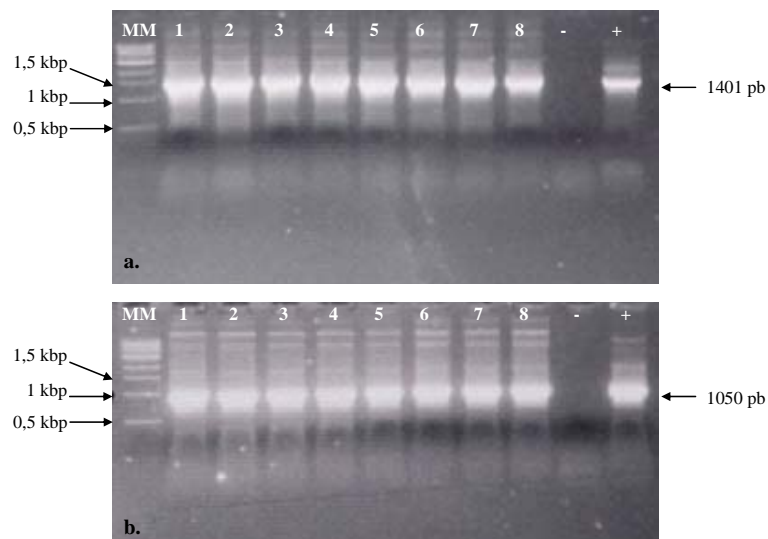


Figure 49 - Criblage de colonies bactériennes par PCR au cours de la transformation du PKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7 par amplification du gène VP3 (a.) et du gène VP7 (b.). MM : Marqueur de poids moléculaire, 1 à 8 : colonies bactériennes, - : contrôle négatif, + : contrôle positif.

Afin de valider l'insertion du gène VP7 dans le plasmide, nous réalisons une digestion enzymatique avec SpeI / NotI sur les 8 clones. Tous les échantillons testés présentent une bande spécifique à 1077 pb, correspondant à la taille du gène VP7 et du promoteur pIL1 et une bande à 7102 pb correspondant au plasmide pKSCATpSGPT-VP3.

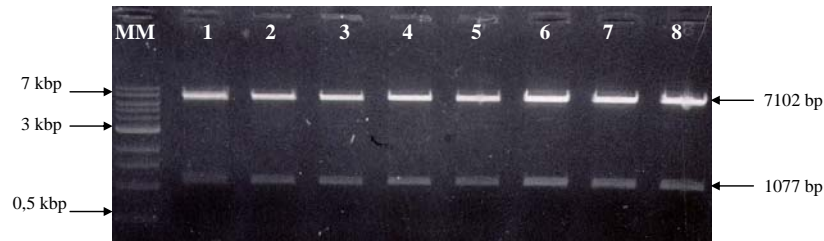


Figure 50 - Digestions enzymatiques par SpeI/NotI des plasmides pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7. MM : Marqueur de poids moléculaire, 1 à 8 : mini-préparations.

Le clone 1 est choisi pour l'amplification en maxi-préparation et le séquençage de vérification.

2-2 - Validation de l'expression *in vitro* du capripoxvirus double recombinant

La validation par expression transitoire permet de vérifier la fonctionnalité *in vitro* de chacun des gènes de la construction plasmidique. L'expression du gène d'intérêt VP7 peut se mesurer dans un premier temps par la technique d'immunofluorescence (figure 51). L'illustration présente le témoin négatif (a) correspondant à des cellules OA3Ts non infectées. L'illustration (b) présente le niveau d'expression du plasmide de transfert exprimant le gène de la VP7, pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7. Nous constatons que l'expression de la protéine VP7 est intense et homogène, confirmant ainsi la puissance du promoteur pIL1.

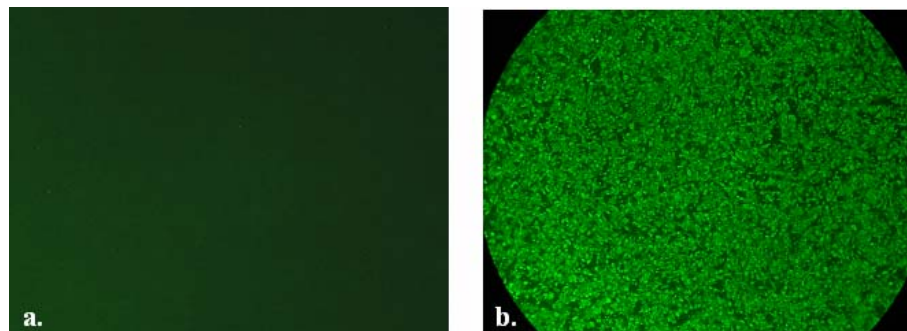


Figure 51 - Détection par immunofluorescence de l'expression des protéines VP7 par des cellules OA3Ts transfectées avec le capripoxvirus double recombinant. **a.** Cellules témoins, **b.** Cellules transfectées avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pil1-VP7.

La validation de l'expression du gène VP3 s'est effectuée par la technique de RT-PCR à partir de l'ARNm.

La figure 52 présente un gel d'agarose (1% TBE + BET) avec les produits d'amplification obtenus d'une PCR basée sur les gènes d'intérêts VP3 et VP7. Les premiers puits, identifiés ADNc, correspondent aux produits d'expression du double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7, les deuxièmes puits ARNm, correspondent aux ARNm initiaux. Une amplification spécifique a été obtenue dans les ADNc pour chacun de ces deux gènes à une taille de 1050 pb et 1401 pb, correspondant respectivement au gène VP7 et au gène VP3. Aucune amplification n'est obtenue dans les ARNm initiaux. Ce résultat permet de valider l'expression *in vitro* du double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7.

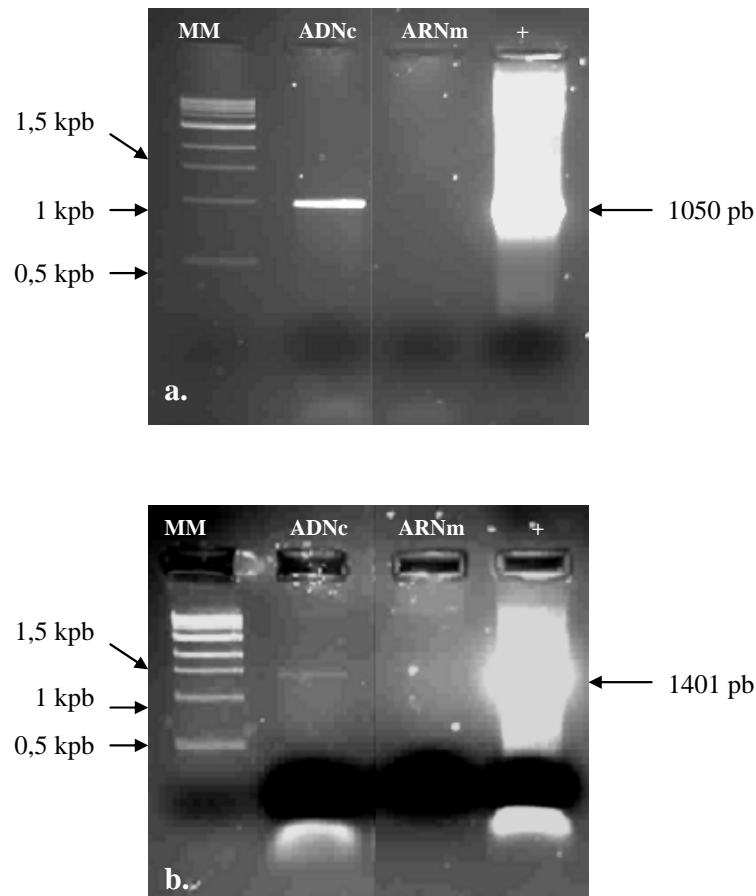


Figure 52 - Expression de l'ARNm lors de l'expression *in vitro* du double recombinant. **a.** Amplification du gène VP7, **b.** Amplification du gène VP3. **MM** : Marqueur de poids moléculaire, **ADNc** : ADN complémentaire, **ARNm** : ARN messenger, **+** : contrôle positif.

2-3 - Microscopie électronique en transmission

Après observation au microscope électronique en transmission des transfections réalisées, aucune pseudo-particule virale n'a été visualisée. Seuls des virions de capripoxvirus sont observés en très grande quantité à l'intérieur des cellules. La figure 53a, présente le cytoplasme d'une cellule OA3Ts envahit par de nombreuses particules virales. L'ultrastructure du virion du capripoxvirus est présenté en figure 53b ; Les trois constituants essentiels du virion s'observent clairement: l'enveloppe (E), les corps latéraux (CL) et le nucléoïde (N) biconcave en section longitudinale.

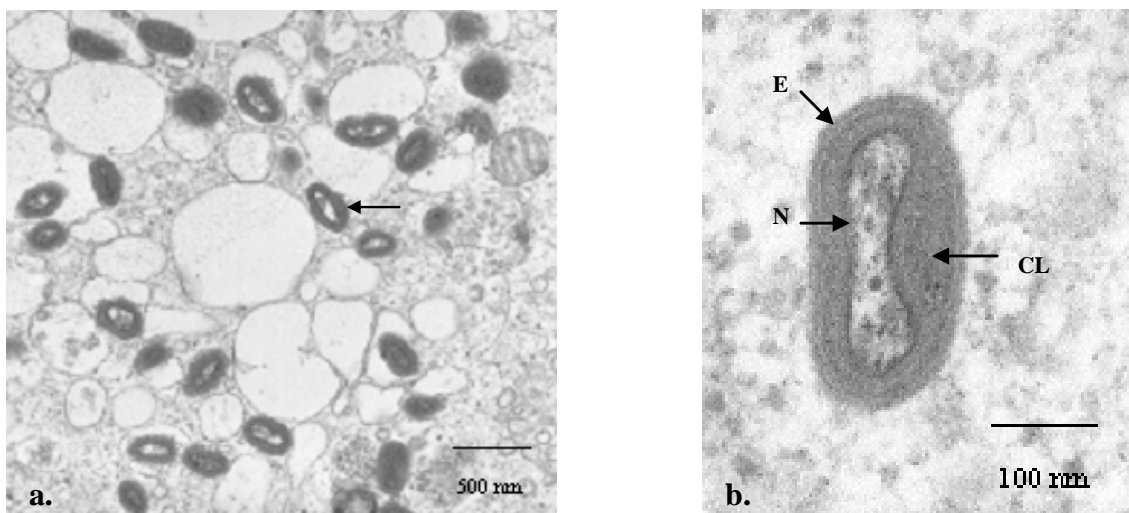


Figure 53 - Observation au MET de virions de capripoxvirus, souche KS-1 (Photos D. Gargani). **a.** Nombreuses particules virales de poxvirus au sein d'une même cellule, **b.** Ultrastructure d'un virion du capripoxvirus. **E** : Enveloppe externe, **N** : Nucléoïde, **CL** : Corps latéraux.

Une seconde expérimentation, réalisée selon la même technique mais avec une co-transfection des cellules avec le plasmide double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7 (8 µg) et le plasmide simple recombinant pKSCATpSGPT-VP3 (40 µg) a permis de mettre en évidence une importante expression de la protéine VP7. Sur la figure 54a, cette expression protéique est visible sous forme de masses denses grises. Le marquage spécifique (figure 54b, points noirs) est retrouvé dans tout le cytoplasme des cellules infectées.

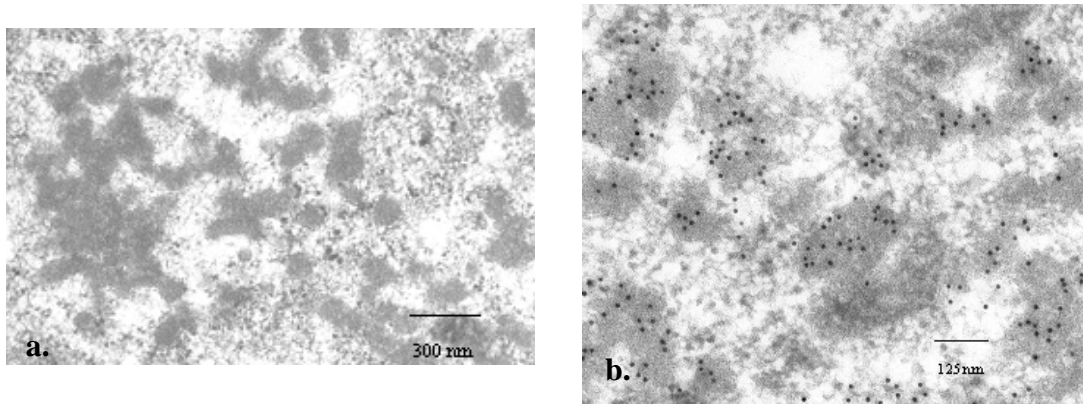


Figure 54 - Observation au MET de l'expression de la protéine VP7 du virus FCO, après transfection de cellules OA3Ts avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7 (Photos D. Gargani). **a.** Expression de la protéine VP7, **b.** Immuno-marquage de la protéine VP7 (points noirs).

Sur une coupe de cellules transfectées avec le double recombinant, il a été observé une structure particulière d'une taille d'environ 60 nm, composée d'un ensemble de structures similaires à des microtubules (fléchée sur la figure 55) et à des assemblages linéaires. Il pourrait s'agir de pseudo-particules virales du virus de la FCO.

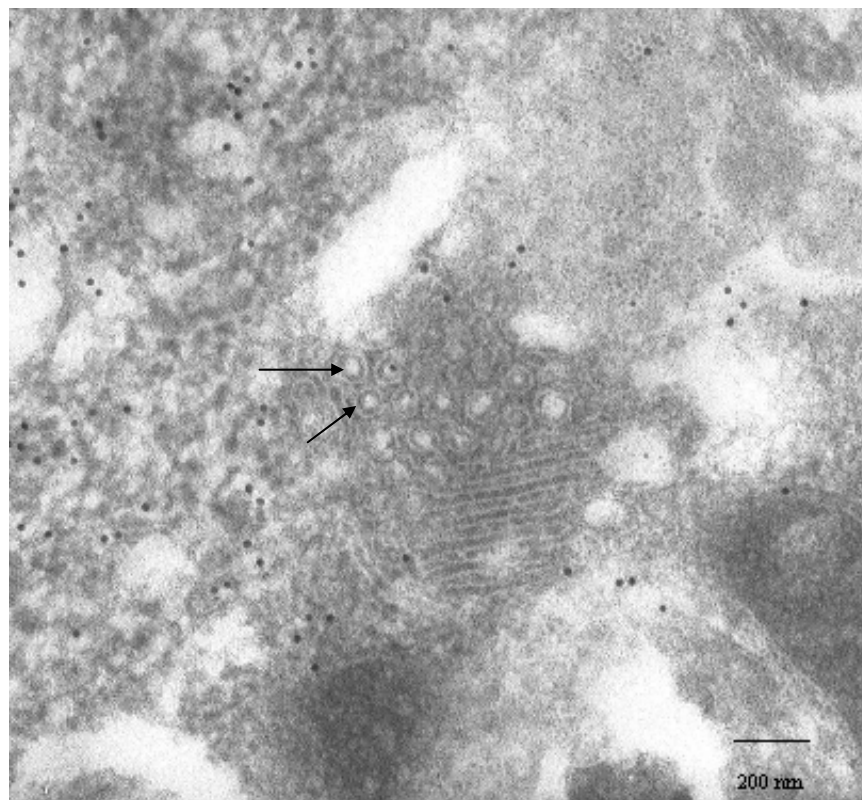


Figure 55 - Observation en MET de possibles pseudo-particules virales (→) du virus de la FCO (Photo D. Gargani).

3 - Conclusion

Après observation en immunofluorescence et immunogold en microscopie électronique en transmission, il apparaît que la protéine VP7 est surexprimée dans les cellules OA3Ts transfectées avec le double recombinant pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7. N'ayant pas les anticorps nécessaires pour le marquage de la protéine VP3, nous n'avons pu évaluer son niveau d'expression. Toutefois, au regard des résultats de RT-PCR sur les ARNm, il est probable que cette expression soit inférieure à celle de la VP7. Le différentiel recherché entre l'expression de la VP7 et celle de la VP3 est de 6 pour 1 (780 molécules de VP7 pour 120 molécules VP3 dans un virion). Nous ne pouvons pas déterminer à ce stade le ratio que nous obtenons avec nos constructions. Nous estimons toutefois que ce ratio n'est pas optimisé car le nombre de pseudo-particules virales VP3-VP7 observé en MET est très inférieur au potentiel attendu au regard de la quantité de VP7 exprimée. Ce travail nécessite d'être poursuivi.

Discussion et Perspectives

DISCUSSION ET PERPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au développement de vaccins dits de « nouvelle génération » contre la fièvre catarrhale ovine, basés sur un vecteur capripoxvirus exprimant différents gènes du virus de la FCO.

La fièvre catarrhale ovine est une maladie virale, infectieuse, non contagieuse, pouvant engendrer de fortes pertes économiques dans les cheptels touchés, et principalement dans la filière ovine. Elle est due à un virus de la famille des *Reoviridae* appartenant au genre *Orbivirus* : le virus de la FCO ou Bluetongue Virus (BTV), dont 24 sérotypes sont connus à l'heure actuelle. La maladie sévit de manière endémique dans les régions d'Afrique subsaharienne (Lefèvre, 2003) et depuis peu dans de nombreuses régions du pourtour méditerranéen. Dans les régions d'endémies, les races locales résistantes à l'infection par la FCO ne présentent généralement pas de signes cliniques. En revanche, les tentatives d'amélioration de ces races locales sont largement freinées par la persistance de la maladie. Peu de vaccins sont disponibles pour lutter contre cette maladie. Ces vaccins sont de type atténués ou inactivés et sont donc spécifiques d'un sérotype donné. Ils sont utilisés sous forme monovalente ou multivalente selon le contexte épidémiologique de la zone à vacciner. L'utilisation de vaccins multivalents peut être problématique puisque l'induction de la réponse immunitaire peut varier en fonction du sérotype présent dans la préparation vaccinale (Verwoerd & Erasmus, 1994). A ce jour, leur utilisation ne permet pas de différencier un animal vacciné d'un animal infecté (stratégie DIVA). L'usage d'un vaccin marqué permettrait d'effectuer des enquêtes de surveillance épidémiologique pour suivre l'évolution de l'infection dans une zone donnée, voire viser à l'éradication de la maladie lorsque la circulation virale est très limitée. La nécessité de développer un vaccin multivalent marqué conférant une immunité protectrice de longue durée trouve toute son importance dans les pays nord africains et du pourtour méditerranéen où de nombreux animaux sont déjà séropositifs pour certains sérotypes de la FCO, sans présenter de signes cliniques.

En Afrique subsaharienne sévissent, en plus de la FCO, des maladies virales contagieuses inoculables provoquées entre autres par des virus appartenant au genre *Capripoxvirus* et affectant respectivement les ovins, les caprins, et les bovins: le virus de la clavelée du mouton, le virus de la variole caprine et le virus de la dermatose

nodulaire contagieuse. Les *Capripoxvirus* ont des propriétés immunologiques communes qui induisent une protection croisée entre les différents membres du genre (Kitching *et al.*, 1986). L'utilisation de souches atténuées protège ainsi contre les trois infections à *Capripoxvirus* (Kitching *et al.*, 1987 ; Kitching, 2003). Dans le cas de la dermatose nodulaire contagieuse, deux souches sont couramment utilisées dans des campagnes de vaccination, la souche Neethling (origine Afrique du Sud) et la souche KS-1 (origine Afrique de l'Ouest) (Carn, 1993). Cette dernière est thermorésistante et son pouvoir de diffusion est très limité. Dans les zones où coexistent les différentes pathologies (figure 1), FCO et capripoxviroses, les coûts élevés engendrés par les campagnes de vaccination systématiques des petits ruminants ainsi que l'accès difficile aux cheptels sont un frein important pour une prophylaxie efficace. L'intérêt de combiner des vaccins protégeant les animaux contre plusieurs pathologies apparaît alors de façon plus évidente pour les pays du Sud.

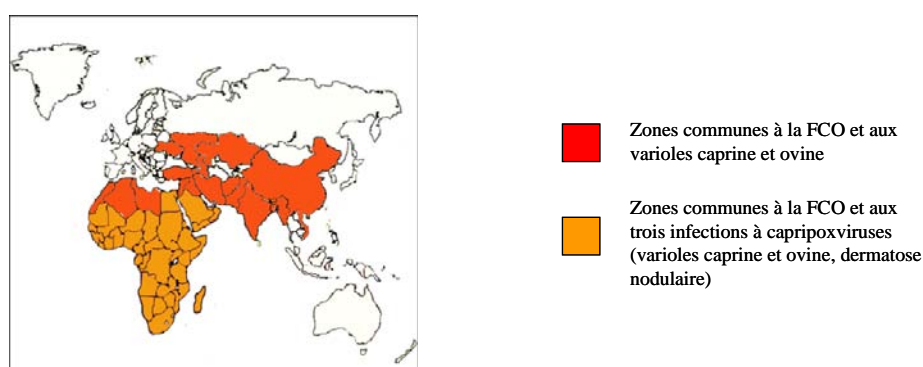


Figure 56 - Répartition géographique de la FCO et des infections à capripoxvirus (varioles ovine et caprine, Dermatose nodulaire contagieuse). D'après Fehri & Lefèvre, 2003 ; Lefèvre 2003 ; Lefèvre & Gourreau, 2003.

Les vecteurs poxvirus sont connus depuis longtemps comme étant d'excellents vecteurs viraux et notamment le capripoxvirus qui est très intéressant pour immuniser les animaux puisqu'il répond aux trois exigences posées par notre problématique :

- L'induction d'une immunité protectrice de longue durée (Ngichabe *et al.*, 2002) : En effet des études précédentes ont montré le potentiel de ce type d'approche en terme d'immunité protectrice (Wade-Evans *et al.*, 1996 ; Berhé *et al.*, 2003). Il a également été montré que le vecteur capripoxvirus induisait préférentiellement une réponse à médiation cellulaire. L'objectif de notre stratégie vaccinale est de générer des lymphocytes mémoires contres

les antigènes de la FCO ce qui permettrait de générer une réponse immunitaire plus rapide et efficace en cas d'infection par le virus de la FCO.

- La protection contre une majorité de sérotypes : en théorie, si on inclut un antigène conservé entre les sérotypes, on peut espérer engendrer un vaccin permettant de protéger contre plusieurs sérotypes.
- La différenciation entre les animaux vaccinés et les animaux infectés (stratégie DIVA) : les capripoxvirus recombinants FCO sont d'excellents candidats pour ce type d'approche. En effet, les vecteurs viraux exprimant seulement certains gènes du virus de la FCO permettraient de distinguer les animaux vaccinés, des animaux infectés naturellement, grâce un test de détection immunoenzymatique (ELISA) basé sur un gène non exprimé par le vecteur poxviral.

Le développement d'un vaccin contre la FCO à base d'un vecteur poxvirus portant la valence FCO et la valence capripoxvirus est particulièrement intéressant pour les pays où la FCO et les capripoxviroses coexistent. La thermorésistance du vecteur capripoxvirus est également un atout par rapport à d'autres vaccins mono- ou multivalents pour une vaccination dans les pays du Sud où la chaîne du froid est difficile à maintenir. La possibilité de produire différents capripoxvirus avec différentes valences ajoutées, comme la peste des petits ruminants (Berhé *et al.*, 2003), la fièvre de la vallée du Rift (Wallace *et al.*, 2006) ou encore la FCO qui a fait objet de cette étude, permettrait alors de disposer à terme d'une « boîte à outils » avec des vaccins adaptables à chaque situation épidémiologique.

Choix des gènes d'intérêts

Le choix des gènes de la FCO à insérer dans le génome du capripoxvirus s'est porté sur les gènes les mieux conservés entre les sérotypes afin de protéger contre un grand nombre de sérotypes de la FCO. Nous avons donc choisi de travailler avec les protéines non structurales, NS1, NS2 et NS3 ainsi qu'avec la protéine structurale VP7. Différents travaux ont montré le pouvoir immunogène de ces protéines. Ainsi Wade-Evans *et al.*, 1996, ont montré la capacité d'un capripoxvirus exprimant la protéine de structure VP7 du virus de la FCO, à générer une réponse immunitaire protectrice via un mécanisme à médiation cellulaire après une épreuve homologue. De plus, les protéines non structurales NS1 et NS2 semblent induire également une immunité de type

cellulaire (Jeggo & Wardley, 1982a ; 1982b ; 1982c ; Jeggo *et al.*, 1983 ; 1984b ; 1985 ; Jeggo & Wardley, 1985 ; Andrew *et al.*, 1995 ; Jones *et al.*, 1997). Ces dernières s'accumulent en grande quantité pendant la réplication virale et génèrent respectivement des lymphocytes T cytotoxiques (LTc) chez le mouton et chez la souris. Cette réponse cellulaire, notamment basée sur les LTc peut théoriquement conférer une immunité protectrice de longue durée. Notre stratégie vaccinale a pour objectif de générer des LTc mémoires contre des antigènes conservés du virus de la FCO afin de protéger les animaux contre un maximum de sérotypes. La protéine VP2 est très variable entre les sérotypes mais elle est la cible des anticorps neutralisants. Nous l'avons donc incluse dans notre démarche dans l'idée d'avoir les meilleures chances d'aboutir à un résultat préliminaire probant.

Pour réaliser ce travail de thèse, nous avons élaboré des plasmides de transfert, spécifiques de chacun des gènes d'intérêt concernés, VP2, VP7, NS1, NS3 afin de permettre l'étape de recombinaison homologue entre ces plasmides et le génome du capripoxvirus lui-même. Une fois l'intégration de la cassette permettant l'expression des différents gènes effectuée, l'efficacité en terme de protection des capripoxvirus recombinants FCO a été testée au cours d'expérimentations *in vivo* chez des chèvres et des moutons.

Constructions plasmidiques : choix de la méthode de sélection

La première étape de ce travail de thèse a été de générer les différentes constructions plasmidiques permettant l'étape de recombinaison homologue avec le génome du capripoxvirus. Seulement quatre constructions ont pu aboutir : Cpox-NS1, Cpox-NS3, CPox-VP2 et CPox-VP7. Initialement, nous avons choisi de travailler avec tous les gènes codant pour les protéines non structurales, NS1, NS2 et NS3 comportant des séquences plus conservées entre les différents sérotypes et les protéines structurales, VP2 et VP7. Malheureusement, le virus recombinant NS2 n'a jamais abouti. La construction du pKSCATpSGPT-NS2 a pu être réalisée mais l'expression *in vitro* de la protéine NS2 dans les cellules OA3Ts au cours des étapes d'expression transitoire et de transfection n'a pas pu être démontrée.

Après vérification de la fonctionnalité des gènes exprimés par les différents plasmides de transfert sur des lignées cellulaires sensibles, la production des virus

recombinants a pu être entreprise. Nous avons obtenu après purification complète quatre virus recombinants spécifiques de chacun des gènes d'intérêt. Cependant, un certain nombre de difficultés quant à la purification des capripoxvirus recombinant FCO générés, ont été rencontrées. La sélection basée sur le gène *Ecogpt* est partiellement efficace et ne permet pas une élimination totale et rapide du virus parental non recombinant. En effet, la multiplication des capripoxvirus recombinants FCO nécessite un temps de culture assez long (d'au minimum 9 jours au cours des premières étapes de sélection) pour engendrer un ECP. Durant ce laps de temps, les virus parentaux échappent à la pression de sélection et sont donc multipliés et amplifiés sur le même support cellulaire avant les virus recombinants. Deux approches ont été envisagées pour palier à ce problème :

- Augmenter ou diminuer la pression de sélection en faisant varier les concentrations en acide mycophénolique, hypoxanthine et xanthine, solutions qui composent le milieu sélectif, de façon à limiter la multiplication du virus parental KS-1.
- Choisir un autre système de sélection ou compléter le système existant *Ecogpt* avec un second marqueur de sélection.

Concernant la première approche, des variations des concentrations d'acide mycophénolique, de xanthine et d'hypoxanthine ont été testées. Nous avons réalisé une cinétique d'infection de la souche KS-1 sur des cellules OA3Ts, dans trois milieux de sélection de concentrations différentes. Le premier milieu correspondait au milieu utilisé en routine (milieu sélectif 1X, MS1X) ; le deuxième milieu correspondait au précédent mais deux fois plus concentré (milieu sélectif 2X, MS2X) et le dernier était celui utilisé par Falkner *et al.*, 1988 lors des processus de sélection des virus recombinants générés avec le virus de la vaccine. Le tableau 13 résume les concentrations en acide mycophénolique, hypoxanthine et xanthine de ces trois milieux.

	Milieu sélectif 1X	Milieu sélectif 2X	Milieu Falkner <i>et al.</i>
Acide mycophénolique (µg/ml)	100	200	25
Xanthine (µg/ml)	300	600	250
Hypoxanthine (µg/ml)	27,2	54,4	15

Tableau 13 - Concentrations des différents milieux sélectifs testés lors des processus de sélection des virus recombinant. **MS1X** : Milieu Sélectif concentré 1 fois, **MS2X** : Milieu Sélectif concentré 2 fois, **MS Falkner *et al.*** : Milieu Sélectif utilisé par Falkner *et al.*, 1988 lors des processus de sélection du virus recombinant vaccine.

En augmentant la pression de sélection (MS2X), nous augmentons la mortalité cellulaire de manière importante. En diminuant la pression de sélection (milieu selon Falkner *et al.*, 1988), le virus KS-1 se multiplie presque aussi rapidement qu'en milieu non sélectif, ce qui ne laisse pas le temps au capripoxvirus recombinant de se multiplier. Il nous a donc fallu jouer sur un ratio mortalité cellulaire/croissance du virus parental et les concentrations que nous avons adoptées (MS1X) étaient finalement les plus adaptées.

Dans un second temps, nous avons utilisé un autre système de sélection positif basé sur le gène de la green fluorescent protein (GFP) d'*Aequorea victoria*, une méduse bioluminescente. Ce système permet une visualisation rapide, au microscope à fluorescence, des cellules ayant intégré le gène GFP. La figure 57c présente l'observation au microscope à fluorescence d'une transfection faite sur des cellules OA3Ts avec le plasmide de transfert pKSCATpSGFP portant le gène VP2 de la FCO. Un grand nombre de cellules présente une fluorescence, ce qui confirme l'efficacité de ce système de sélection. En revanche, aucune pression de sélection sur le virus parental n'est effectuée ce qui ne permet donc pas une élimination de la souche non recombinante. En outre, l'ECP observé sur les cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGFP-VP2 (57d.) est trop rapide pour permettre une sélection des virus recombinants par simple observation de fluorescence.

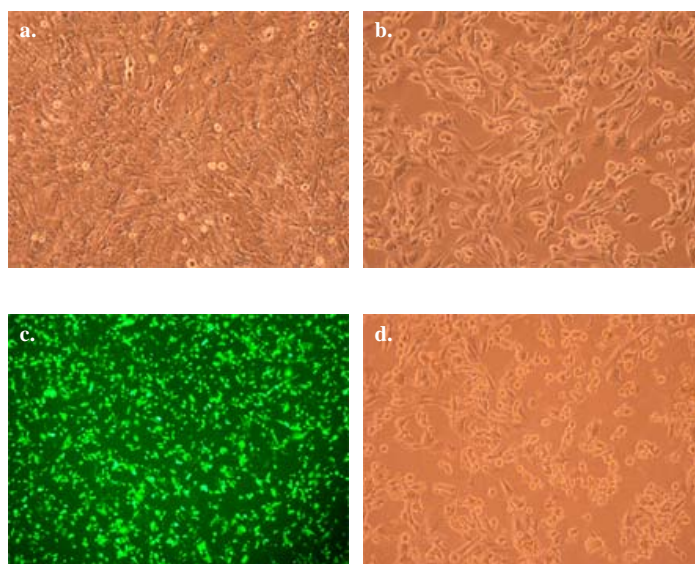


Figure 57 - Transfection de cellules OA3Ts avec le plasmide pKSCATpSGFP-VP2 (grossissement x4). **a.** Contrôle cellules OA3Ts, **b.** Contrôle cellules OA3Ts infectées avec la souche atténuée KS-1, **c.** Cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGFP-VP2 observée au microscope à fluorescence, **d.** Cellules OA3Ts transfectées avec le plasmide pKSCATpSGFP-VP2.

La meilleure stratégie à adopter serait donc de coupler un marqueur de sélection positif (gène GFP) avec un marqueur de sélection négatif basé sur un antibiotique par exemple (gène *Ecogpt*). Ceci permettrait d'accélérer la récolte des virus recombinants et donc d'éviter de prolonger le temps d'incubation des cellules infectées. Dès qu'un ECP se développe, les cellules sont observées au microscope à fluorescence afin de vérifier si les cellules infectées présentent une fluorescence. Nous avons choisi de ne pas adopter cette stratégie de sélection pour deux raisons. A terme, les gènes de sélection doivent être éliminés des virus recombinants : intégrer deux gènes de sélection dans une construction plasmidique signifie donc une étape supplémentaire pour les éliminer. De plus, nous avons choisi une stratégie vaccinale « multi-recombinante » avec l'intégration possible, dans nos constructions Cpox-FCO, d'un autre gène d'intérêt (par exemple, le gène de l'hémagglutinine du virus de la Peste des petits ruminants). Il était donc nécessaire de se limiter à l'utilisation d'un seul marqueur de sélection par construction. Lors de la construction des virus recombinants, le manque d'outils de détection (antisérum spécifique de chacune des protéines exprimées) a également fait défaut. En effet, lors des expressions *in vitro*, l'étape d'extraction de l'ARNm a été nécessaire pour valider l'expression de la majorité des constructions. La production d'immuns-sérums spécifiques n'a pas été possible pour les protéines qui n'avaient pas été produites sous la forme de protéines recombinantes. Seul l'immun-sérum VP7 a pu être produit dans notre cas. Ainsi, pour le recombinant pKSCATpSGPT-VP7, la technique simple d'immunofluorescence nous a permis de valider rapidement l'expression de la protéine VP7.

Validation et amélioration du système vaccinal capripoxvirus

La deuxième étape de ce travail de thèse était de tester la capacité des vaccins capripoxviraux recombinants FCO à générer une réponse immunitaire spécifique et à protéger des animaux éprouvés avec une souche virulente.

Nous avons ainsi généré quatre capripoxvirus recombinants FCO que nous avons testé en terme de réponses immunitaires et de protection par le biais d'expérimentations animales. La première expérimentation, réalisée chez des chèvres, a permis d'évaluer l'immunogénicité des recombinants générés. La seconde, chez les moutons, a permis d'évaluer le niveau de protection conféré par les capripoxvirus recombinants FCO suite à une épreuve homologue.

Chez les chèvres et chez les moutons, une séroconversion contre les gènes NS3, VP2 et VP7 a été observée avant épreuve. De plus, un effet rappel de la réponse humorale est observé chez les animaux déjà immunisés avec les virus recombinants Cpox-FCO et éprouvés avec une souche de sérotype 2 du virus de la FCO. Les animaux développent également une réponse humorale contre le vecteur capripoxvirus. Ces résultats montrent la capacité des capripoxvirus à induire une réponse immunitaire chez les moutons et les chèvres. La réponse anti-NS1 n'a pas pu être analysée en raison de problèmes techniques liés à la technique ELISA employée.

Une lymphoblastogenèse et une lymphoprolifération spécifiques sont observées après restimulation des cellules mononuclées du sang périphérique avec l'antigène FCO chez les chèvres. Ce résultat confirme l'immunogénicité de nos constructions recombinantes capripoxvirus. Étonnamment, le niveau de prolifération et d'activation spécifique de l'antigène KS-1 obtenu dans le groupe contrôle (immunisé avec un vaccin capripoxvirus sans rapport avec la FCO portant la valence HPPR) est significativement différent de celui observé pour le groupe Cpox-FCO. Ceci peut s'expliquer par la dose en capripoxvirus injectée dans chacun des groupes. En effet, les chèvres du groupe témoin ont reçu une dose à 2×10^6 DICT₅₀ alors que les animaux du groupe Cpox-FCO ont reçu quatre doses à 2×10^6 DICT₅₀ soit 8×10^6 DICT₅₀. L'analyse de la réponse cellulaire n'a pas pu être réalisée chez les moutons en raison de problèmes techniques rencontrés lors de l'extraction des cellules mononuclées du sang périphérique. Le transport des échantillons a pu être à l'origine des difficultés rencontrées.

L'effet protecteur des vaccins capripoxviraux recombinants FCO a également été évalué chez les moutons après épreuve virulente. Seule une protection partielle a été obtenue. En effet, certains animaux du groupe Cpox-FCO ont développé des signes cliniques et un animal sur 11 est mort. Cependant, l'analyse statistique des scores cliniques obtenus montre une différence significative entre le groupe témoin et le groupe Cpox-FCO composé respectivement de 10 et 11 animaux. Ce résultat ne correspond pas à celui obtenu par Wade-Evans *et al.* 1996 qui ont montré l'induction d'une protection totale et partielle après une épreuve virulente homologue et hétérologue, respectivement, avec un capripoxvirus (la même souche) exprimant la protéine VP7. Aucune information donnée dans l'article de Wade-Evans ne permet de déterminer les raisons de cette différence de résultats.

La faible protection que nous obtenons peut toutefois être due à diverses raisons dont le niveau insuffisant d'expression protéique, une réponse immunitaire inadéquate

ou insuffisamment stimulée. Nous pouvons également nous poser la question du choix des antigènes FCO et du vecteur utilisé. Des études précédentes ont montré que la souche KS-1 exprimant différents transgènes induisait une protection totale des animaux immunisés après une épreuve homologe dirigée à la fois contre le vecteur et contre le transgène (Romero, 1993 ; Berhé *et al.*, 2003). En revanche, nous avons montré *in vitro* que le vecteur capripoxvirus engendre un effet immunosuppresseur sur la prolifération des cellules du sang périphérique. Ceci n'a pas été recherché lors des essais du vaccin capripoxvirus recombinant H-PPR développé au CIRAD (Berhé *et al.*, 2003). Toutefois, le type d'antigène exprimé par le capripoxvirus peut être plus ou moins affecté par l'effet immunosuppresseur induit par le vecteur. Un travail sur le vecteur capripoxvirus dans le cadre d'une vaccination contre la FCO apparaît donc nécessaire. Quant au choix des antigènes, nous avons testé tous les gènes *à priori* les plus immunogènes dans le cadre d'une réponse cellulaire. Seule la protéine non structurale NS2 n'a pas pu être testée. Dès lors, deux possibilités peuvent être envisagées. En premier lieu, il se pourrait, que la réponse immunitaire engendrée soit inadaptée. En effet, peu d'anticorps neutralisants ont été générés chez les animaux immunisés avec les capripoxvirus recombinants FCO et il est possible que ce soit eux les acteurs principaux de la protection. En second lieu, les antigènes exprimés en système capripoxvirus ne sont peut être pas présentés correctement au système immunitaire de l'animal pour générer une réponse suffisante.

Afin d'améliorer notre système vaccinal, nous pouvons d'une part, travailler sur les constructions plasmidiques en modifiant notamment les promoteurs pour augmenter le niveau d'expression et d'autre part, essayer de stimuler davantage ou différemment la réponse immunitaire en ajoutant par exemple des cytokines.

Amélioration des constructions plasmidiques

Il est possible d'augmenter le niveau d'expression des différentes protéines en modifiant les promoteurs. En effet, nous avons montré que le promoteur pIL1 avait une capacité d'expression 6 à 7 fois supérieure à celle des autres promoteurs utilisés classiquement (promoteur p7.5 ou promoteur synthétique pS). Des essais ont été menés avec le gène de la VP7, seule construction permettant d'évaluer par immunofluorescence le niveau d'expression protéique. Nous avons ainsi pu comparer le niveau d'expression de cette protéine se trouvant soit sous contrôle du promoteur

synthétique, pS (figure 58a), soit sous contrôle du promoteur pIL1 (figure 58b), après expression *in vitro* des plasmides pKSCATpSGPT-VP7 et pKSCATpSGPT-pIL1-VP7 respectivement. Il apparaît une nette surexpression de la protéine VP7 dans le cas du deuxième promoteur. Il serait intéressant de valider la totalité de nos constructions plasmidiques sous ce promoteur fort et de comparer le niveau d'expression protéique, notamment via l'ARNm, avec les constructions sous pS.

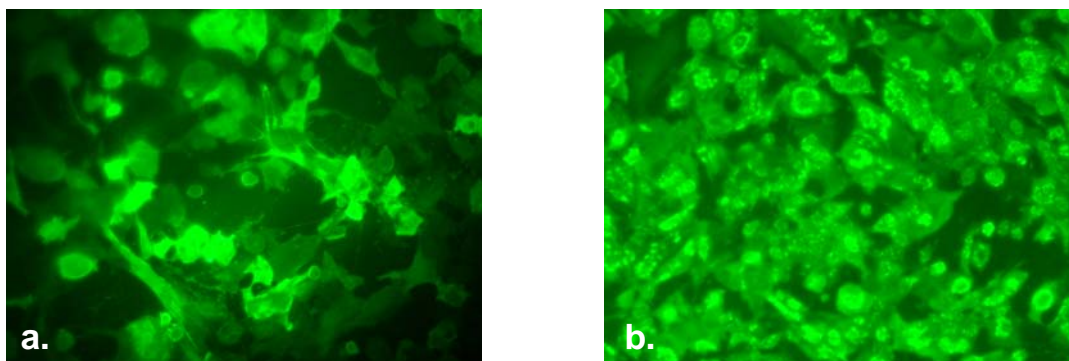


Figure 58 - Expression de la protéine VP7 par immunofluorescence sous contrôle du promoteur synthétique ou du promoteur IL-1. **a.** Plasmide de transfert pKSCATpSGPT-VP7, **b.** Plasmide de transfert pKSCATpSGPT-pIL1-VP7 (grossissement x4).

Amélioration de la réponse immunitaire

Utilisation d'adjuvants

La plupart des protéines sont peu ou non immunogènes lorsqu'elles sont administrées telles quelles. L'utilisation du vecteur capripoxvirus peut en théorie palier à ce problème car il a été montré capable de stimuler efficacement les réponses immunitaires de type cellulaire (Aspden *et al.*, 2003 ; Wallace & Viljoen, 2005). Au vu des résultats obtenus, il serait intéressant d'envisager d'accroître la réponse immunitaire par l'insertion de gènes codants pour des cytokines du type facteur stimulant les populations de granulocytes et de macrophages, GM-CSF (Granulocytes-Macrophages Colony-Stimulating Factor) ou le facteur de croissance hématopoïétique, Flt3L, qui semblent capables d'inciter au recrutement des cellules dendritiques et à la réponse cellulaire en augmentant la réponse immunitaire de type CD4⁺ (Mwangi *et al.*, 2002). Il serait donc possible d'inclure dans nos constructions plasmidiques, en plus des gènes d'intérêts FCO et du gène de sélection *EcoGPT*, un gène codant pour l'expression du

GM-CSF, par exemple, ceci afin de stimuler davantage la réponse immunitaire au cours des expérimentations *in vivo*.

Effet de la dose d'antigènes

L'amplitude de la réponse immune dépend de la dose d'antigènes administrée. Au-dessous d'un certain seuil, les protéines peuvent ne pas induire de réponses immunitaires. Au-dessus, l'augmentation graduelle de la réponse est proportionnelle à l'augmentation de la dose d'antigènes, jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint ; une diminution drastique de la réponse immune intervient lorsque les doses d'antigènes deviennent très fortes (Janeway *et al.* 2003). En effet, pour des doses très élevées, la réponse immune peut être inhibée.

La trop faible protection obtenue au cours de cette expérimentation *in vivo* peut également s'expliquer par une induction insuffisante avec une seule injection et/ou une dose insuffisante. Afin d'augmenter le niveau d'expression des protéines, il a été envisagé un nouvel essai *in vivo* en augmentant les doses injectées et en effectuant un rappel qui permettra peut-être d'obtenir une meilleure protection induite par nos vaccins. Ainsi, deux lots de 8 moutons de race PréAlpes ont été utilisés comme suit : un lot témoin vacciné par voie sous cutanée, avec une dose de 2×10^6 DICT₅₀ du vaccin capripox-HPPR (*groupe témoin*) et un lot vacciné inoculé avec un mélange de capripoxvirus recombinants à 2×10^6 DICT₅₀ chacun (*groupe Cpox-FCO*). Trois semaines après immunisation (J21), un rappel est effectué par voie sous cutanée avec une dose à 2×10^6 TCID₅₀ de chacun des recombinants. Trois semaines après le rappel (J42), les animaux sont éprouvés avec une souche virulente du sérotype 2. La protection est mesurée, comme lors de notre premier essai *in vivo* sans rappel, en évaluant les signes cliniques et les paramètres virologiques. Les premiers résultats observés ne semblent pas en faveur d'une protection totale après une épreuve homologe.

Voie d'immunisation

La voie par laquelle l'antigène est introduit dans l'organisme affecte à la fois l'amplitude et le type de réponse. Habituellement et comme ce fut le cas au cours de nos expérimentations *in vivo*, l'antigène est injecté par voie sous-cutanée (SC). D'autres possibilités telles que la voie intradermique (ID) ou intramusculaire (IM) sont

envisageables. On peut également recourir à l'administration par voie mucoale, c'est-à-dire ingestion par voie orale ou inhalation par voie intranasale.

De prime abord, nous avons choisi l'injection en sous cutanée car de nombreux travaux sur les vecteurs capripoxvirus ont montré l'efficacité de cette voie d'injection. Concernant la voie intradermique, celle-ci induit généralement des réponses plus fortes, probablement parce que l'antigène est capté par les cellules de Langerhans et est présenté de manière efficace dans les ganglions lymphatiques locaux. Pour les différents essais *in vivo* que nous avons effectué, il était impossible d'utiliser la voie intradermique pour des raisons techniques. En effet, l'inoculation de quatre virus recombinants à la fois imposait des volumes à injecter beaucoup trop élevés pour envisager cette possibilité. Il aurait fallu concentrer les différentes formulations vaccinales. L'injection en intramusculaire serait intéressante à tester car en effet, cette voie permet d'exposer de manière différente les antigènes avec une localisation au point d'injection plus fortement vascularisée (Pastoret *et al.*, 1997).

Aussi, l'inoculation par voie orale serait une piste intéressante à développer. En effet, de nombreux poxvirus recombinants ont montré une bonne réponse en terme d'immunité après avoir été injecté par cette voie (Bender, *et al.*, 1996 ; Welter *et al.*, 2000 ; Stevceva *et al.*, 2002 ; Kent *et al.*, 2005). De plus, ce type d'approche engendre, outre une réponse mucoale, une réponse systémique. Un autre avantage à souligner est la facilité d'utilisation avec une immunisation possible de la faune sauvage qui peut représenter un réservoir important de la maladie, mais également la réduction des coûts puisque ce procédé reste à la portée même des éleveurs.

Amélioration de la présentation antigénique

La présentation antigénique par les vaccins simple recombinants Cpo-FCO, exprimant une protéine isolée, n'est peut-être pas optimisée pour obtenir une réponse immunitaire maximale. Des études récentes ont montré qu'un vaccin recombinant canarypoxvirus co-exprimant les deux protéines de la capside externe VP2 et VP5, induisait une excellente protection des moutons après une épreuve homologue (Boone *et al.*, 2007). La reconstitution d'une capside virale par les deux protéines est probablement plus immunogène que chacune des deux protéines produites individuellement. Cependant, l'utilisation des protéines VP2 et VP5 ne permet pas une protection contre une épreuve virulente hétérologue. Nous avons donc envisagé de

travailler sur une nouvelle construction plasmidique co-exprimant les protéines majeures de la capsid interne, VP3 et VP7 (pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7), afin d'évaluer l'immunogénicité et le niveau de protection induits dans un système hétérologue. Après validation *in vitro* de l'expression de chacune des protéines, la microscopie électronique en transmission nous a permis de visualiser une importante expression de la protéine VP7, après un marquage spécifique, et d'observer des structures protéiques pouvant évoquer des structures virales. Cette observation n'a pu se faire que sur une seule cellule et le marquage par immunogold de la protéine VP7 n'est pas de qualité suffisante sur la coupe observée. Ceci ne permet donc pas de conclure quant à la reconstitution d'une capsid interne dans les cellules transfectées avec le plasmide pKSCATpSGPT-VP3-pIL1-VP7. Ne disposant pas d'anticorps anti-VP3, nous ne connaissons pas le niveau exact d'expression de la protéine VP3 et nous ne pouvons réaliser de marquage spécifique et donc localiser la protéine dans les cellules. Cependant, lorsque l'on considère le niveau de détection des ARNm, il semble que le niveau d'expression de cette protéine soit insuffisant pour reconstituer une pseudo-particule virale. Il est donc envisagé de développer une nouvelle construction plasmidique dans laquelle le gène codant pour la protéine VP3 serait sous un promoteur plus fort que celui initialement choisi. Nous avons orienté notre choix vers le promoteur pIL1, qui a prouvé son efficacité par le biais de l'expression de la protéine VP7. Une co-transfection des cellules avec les plasmides exprimant la protéine VP3 et la protéine VP7 sous promoteur pIL1 est alors envisagée. De nouvelles observations en microscopie électronique en transmission seront également réalisées.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis de générer quatre recombinaux poxviraux contre la FCO (VP2, VP7, NS1 et NS3) qui ont su induire une réponse immunitaire de type humorale chez des chèvres et des moutons. Une réponse cellulaire a également pu être montrée chez des chèvres après une épreuve atténuée. Une protection partielle a pu être engendrée lors d'essais expérimentaux chez des moutons éprouvés par une souche virulente. La perspective de la construction d'un vaccin vecteur poxviral, utilisable pour un maximum de sérotypes, est toujours à l'ordre du jour avec la reconstitution possible d'une pseudo particule virale VP3-VP7.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahmed S.I., Leather S.R. Suitability and potential of entomopathogenic micro organisms for forest pest management - some points for consideration. *International journal of pest management*, **1994**, 40 : 287-292.

Albina E., Zientara S., Sailleau C., Perrin A., Cêtre-Sossah C., Bréard E., Grillet E. La fièvre catarrhale ovine (bluetongue): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*, **2007**, 11 : 63-74.

Alexander R.A. The propagation of blue-tongue virus in the developing chick embryo with particular reference to the temperature of incubation. *Onderstepoort journal of veterinary science and animal industry*, **1947**, 22 : 7-26.

Andrew M.E., Coupar B.E. Biological effects of recombinant vaccinia virus-expressed interleukin 4. *Cytokine*, **1993**, 4(4) : 281-286.

Andrew M., Whiteley P., Janardhana V., Lobato Z., Gould A., Coupar B. Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Veterinary immunology and immunopathology*, **1995**, 47(3-4) : 311-322.

Aspden K., Passmore J.A., Tiedt F., Williamson A.L. Evaluation of lumpy skin disease virus, a capripoxvirus, as a replication-deficient vaccine vector. *The Journal of general virology*, **2003**, 84 (8) : 1985-1996.

Baldet T., Mathieu B., Delécolle J.C. Émergence de la fièvre catarrhale ovine et surveillance entomologique en France. *Insectes*, **2003**, 131 : 28-30.

Baldet T., Delécolle J.C., Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Meiswinkel R., Gerbier G. Indoor activity of *Culicoides* sp. In association with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. *Preventive veterinary medicine*, in press, **2007**.

Bansal O.B., Stokes A., Bansal A., Bishop D., Roy P. Membrane organization of bluetongue virus non-structural glycoprotein NS3. *Journal of virology*, **1998**, 72(4) : 3362-3369.

Barber T.L. Temporal appearance, geographic distribution and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. *American journal of veterinary research*, **1979**, 40 : 1654-1656.

Baxby D. Is cowpox misnamed? A review of 10 human cases. *British medical journal*, **1977**, 1 : 1379-1381.

Baxby D. Jenner's smallpox vaccine. The riddle of the origin of vaccinia virus. William Heinemann Ltd., London, **1981**.

Beaton A.R., Rodriguez J., Reddy Y.K., Roy P. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **2002**, 99 : 13154-13159.

Beckenbach A.T., Borkent A. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxydase subunit 2. *Molecular phylogenetics and evolution*, **2003**, 27 : 21-35.

Bedson H.S., Dumbell K.R. Hybrids derived from the viruses of variola with vaccinia virus. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **1964**, 54 : 577-585.

Bender B.S., Rowe C.A., Taylor S.F., Wyatt L.S., Moss B., Small P.A. Jr. Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza. *Journal of virology*, **1996**, 70 (9) : 6418-6424

Berhé G., Minet C., Le Goff C., Barrett T., Ngangnou A., Grillet C., Libeau G., Fleming M., Black D.N., Diallo A. Development of a dual recombinant vaccine to

protect small ruminants against peste-des-petits-ruminants virus and capripoxvirus infections. *Journal of virology*, **2003**, 77(2) : 1571-1577.

Bertagnoli S. Poxvirus. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003a**, pp. 407-414.

Bertagnoli S. Autres poxviroses. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003b**, pp. 475-484.

Blackburn N.K., Searle L., Phelps R.J. Viruses isolated from *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) caught at the Veterinary Research Farm, Mazowe, Zimbabwe. *Journal of entomological society of South Africa*, **1985**, 48 : 331-336.

Blancou J., Kieny M.P., Lathe R., Lecocq J.P., Pastoret P.P., Soulehot J.P., Desmettre P. Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature*, **1986**, 322 : 373-375.

Boone J.D., Balasuriya U.B., Karaca K., Audonnet J.C., Yao J., He L., Nordgren R., Monaco F., Savini G., Gardner I.A., Maclachlan N.J. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine*, **2007**, 8 ; 25(4) : 672-678.

Boorman J. Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes. *The veterinary record*, **1986**, 118-121.

Boorman J. *Culicoides* of the Arabian Peninsula with notes on their medical and veterinary importance. *Fauna Saudi Arabia*, **1989**, 160-224.

Borden E.C., Shope R.E., Murphy F.A. Physicochemical and morphological relationships of some arthropod-borne viruses to bluetongue virus – a new taxonomy group. Physicochemical and serological studies. *Journal of general virology*, **1971**, 13 : 261-271.

Boyle D.B., Coupar A.E.H, Both G.W. Multiple-cloning-site plasmids for the rapid construction of recombinant poxviruses. *Gene*, **1985** ; 35(1-2) : 169-177.

Boyle D.B., Coupar A.E.H. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene*, **1988**, 65 : 123-128.

Braverman Y., Boorman J., Kremer M. Faunistic list of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Israel. *Les cahiers de l'ORSTOM*, **1976**, 14 : 179-185.

Bréard E., Sailleau C., Coupier H., Mure-Ravaud K., Hammoumi S., Gicquel B., Hamblin C., Dubourget P., Zientara S. Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Veterinary Research*, **2003**, 34(6) : 777-789.

Brochier B., Languet B., Blancou J., Thomas I., Kieny M.P., Costy F., Desmetrre P., Pastoret P.P. Use of recombinant vaccinia rabies virus for oral vaccination of wildlife against rabies. *Journal of wildlife diseases*, **1989**, 25 : 540-545.

Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Baudouin B., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K., Libois R., Pastoret P.P. Large scale eradication of rabies with a recombinant vaccinia-rabies virus. *Nature*, **1991**, 354 : 520-522.

Brochier B., Kieny M.P., Costy F., Coppens P., Baudouin B., Lecocq J.P., Languet B., Mosselmans F., Beier R., Lecomte L., Mullier P., Roland H., Kervyn T., Renders C., Escutenaires S., Pastoret P.P. Elimination de la rage en Belgique par la vaccination du renard roux (*Vulpes*). *Annales de médecine vétérinaire*, **2001**, 145 : 293-305.

Brookes S.M., Hyatt A.D., Eaton B.T. Characterization of virus inclusion bodies in bluetongue virus-infected cells. *Journal of General Virology*, **1993**, 74 : 525-530.

Bublot M., Pritchard N., Swayne D.E., Selleck P., Karaca K., Suarez D.L., Audonnet J.C., Mickle T.R. Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2006**, 1081 : 193-201.

Buller R.M., Smith G.L., Cremer K., Notkins A.L., Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*, **1985**, 317 : 813-815.

Buller R.P., Potter M., Wallace G.D. Variable resistance to ectromelia (mousepox) virus among genera of *Mus*. *Current topics in microbiology and immunology*, **1986**, 127 : 319-322.

Buller R.M.L., Palumbo G.J. Poxviruses pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*, **1991**, 55(1) : 80-122.

Campbell C.H. Immunogenicity of bluetongue virus inactivated by gamma irradiation. *Vaccine*, **1985**, 3 : 401-411.

Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabrò A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale M., Mellor P.S. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *The Veterinary Record*, **2003**, 19 ; 153(3) : 71-74.

Carn V.M. Control of capripoxvirus infections. *Vaccine*, **1993**, 11(13) : 1275-1279.

Carroll M.W., Moss B. *E. Coli* beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, **1995**, 19 : 352-354.

Cêtre-Sossah C., Baldet T., Delécolle J.C., Mathieu B., Perrin A., Grillet C., Albina E. Molecular detection of *Culicoides spp.* and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, **2004**, 35(3) : 325-337.

Chakrabarti S., Brechling K., Moss B. Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Molecular and cellular biology*, **1985**, 5 : 3403-3409.

Chakrabarti S., Sisler J. R., and Moss B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques*, **1997**, 23 : 1094-1097.

Clavijo A., Heckert R.A., Dulac G.C., Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of virological methods*, **2000**, 87(1-2) : 13-23.

Clavijo A., Sepulveda L., Riva J. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *The veterinary record*, **2002**, 7 : 301-302.

Collier L.H. The development of a stable Smallpox vaccine. *The journal of hygiene*, **1955**, 53 : 76-101.

Cowley J.A., Gorman B.M. Cross-neutralisation of genetic reassortants of bluetongue virus serotypes 20 and 21. *Veterinary microbiology*, **1989**, 19 : 37-51.

Dallas J.F., Cruickshank R.H., Linton Y.M., Nolan D.V., Patakakis M., Braverman Y., Capela R., Capela M., Pena I., Meiswinkel R., Ortega M.D., Baylis M., Mellor P.S., Mordue Luntz A.J. Phylogenetic status and matrilineal structure of the biting midge, *Culicoides imicola*, in Portugal, Rhodes and Israel. *Medical and veterinary entomology*, **2003**, 17(4) : 379-387.

Daniels P.W., Sendow I., Soleha E., Sukarsih E., Hunt N.T., Bahri S. Australian-Indonesian collaboration in veterinary arbovirology - a review. *Veterinary microbiology*, **1995**, 46 : 151-174.

Davies F.G. Characteristics of a virus causing a pox disease in sheep and goat in Kenya with observations on the epidemiology and control. *The Journal of hygiene*, **1976**, 76 : 163-171.

Delécolle J.C. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. *Thèse d'Etat*, Université Louis Pasteur, **1985**, 239 p.

Delécolle J.C., de La Rocque S. Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin de la société entomologique de France*, **2002**, 107 (4) : 371-379.

Delécolle J.C., Schaffner F. Vecteurs des arboviroses, *Culicoides*. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 123-138.

De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Scaramozzino P., Amaddeo D., Cardeti G., Scicluna M., Ferrari G., Autorino G.L. Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *The veterinary record*. **2005**, 156(10) : 301-314.

Diallo A., Minet C., Berhé G., Le Goff C., Black D.N., Fleming M., Barrett T., Grillet C., Libeau G. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2002**, 969 : 88-91.

Di Eminio B., Nicolussi P., Patta C., Ronchi G.F., Monaco F., Savini G. Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2. *Veterinary Italiana*, **2004**, 40 : 640-644.

Dominguez J., Lorenzo M.M., Blasco R. Green fluorescent protein expressed by a recombinant vaccinia virus permits early detection of infected cells by flow cytometry. *Journal of immunological methods*, **1998**, 220, 115-121.

Downie A.W. A study of the lesions produced experimentally by cowpox virus. *Journal of Pathology*, **1939**, 48 : 361-378.

Dubbs D.R., Kits S. Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in TK inducing activity. *Virology*, **1964**, 22 : 214-225.

Dulac G.C., Duboc C., Meyers D.J., Taylor E.A., Ward D., Sterritt W.G. Incursion of bluetongue virus type 11 and epizootic hemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagan Valley. *Canadian Veterinary Medical Association*, **1989**, 30 : 351-354.

Dulac G.C., Sterritt W.G., Dubuc C., Afshar A., Myers E.A. Incursions of orbiviruses in Canada and their serologic monitoring in the native animal population between 1962 and 1991. In: Walton and Osburn eds., **1992**, pp. 120-127.

Du Toit R.M. The transmission of bluetongue and horse sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **1944**, 19 : 7-16.

Eloi M. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants, *INRA Production Animale*, **1998**, 11(1), 5-1.

Els H.J., Verwoerd D.W. Morphology of bluetongue virus. *Virology*, **1969** ; 38(2) : 213-219.

Erasmus B.B. The history of bluetongue. In: Barber T.L., Jochim M.M., *Bluetongue and related Orbiviruses*, eds. Progress in clinical and biological research. Vol.178. New York: Alar R. Liss, **1985**, pp. 7-12.

Falkner F.G., Moss B. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *Journal of virology*, **1988**, 62 : 1849-1854.

FAO, Santé animale, Fiche maladies, Bluetongue - Vectors and Intermediate Hosts.
<http://www.fao.org/AG/AGAINFO/subjects/fr/health/diseases-cards/bluetongue.html>

Fassi-Fehri M., Lefèvre P.C. Clavelée et variole caprine. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 415-427.

Fauquet C.M. Virus taxonomy. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball, Editors, *Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier Academic Press, **2005**, pp 328-347.

Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. World Health Organization, Geneva, **1988**.

Ferrari G., De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Zini M., Farina F. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Preventive veterinary medicine*, **2005**, 68 : 10-13.

Franke C.A., Rice C.M., Strauss J.H., Hruby D.E. Neomycin resistance as a dominant selectable marker for selection and isolation of vaccinia virus recombinants. *Molecular and cellular biology*, **1985**, 5 : 1918-1924.

French T.J., Marshall J.J., Roy P. Assembly of double-shelled, virus like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *Journal of Virology*, **1990**, 64(12) : 5695-5700.

French T.J., Roy P. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *Journal of Virology*, **1990**, 64(4) : 1530-1536.

Gambles R.M. Bluetongue of sheep in Cyprus. *Journal of comparative pathology*, **1949**, 59 : 176-190.

Gerry A.C., Mullens B.A. Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) at a southern California dairy, with reference to potential bluetongue virus transmission and persistence. *Journal of Medical Entomology*, **2000**, 37(5) : 675-688.

Gibbs E.P.J., Greiner E.C. Bluetongue and epizootic hemorrhagic disease. The arboviruses: epidemiology and ecology. Volume II, **1988**, 39-70.

Gibbs E.P.J., Greiner E.C. The epidemiology of bluetongue. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases*, **1994**, 17 : 207-220.

Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslac J.P., Paoletti E. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, **1990**, 179 : 247-266.

Gomulski L.M., Meiswinkel R., Delécolle J.C., Goffredo M., Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **2006**, 20(2) : 229-238.

Gouet P., Diprose J.M., Grimes J.M., Malby R., Burroughs J.N., Zientara S., Stuart D.I., Mertens P.P. The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cells*, **1999**, 14 ; 97(4) : 481-490.

Gould A.R. Conserved and non-conserved regions of the outer coat protein, VP2, of the Australian and South African isolates. *Archives of virology*, **1988**, 99 : 205-220.

Gould A.R. & Hyatt A.D. The Orbivirus genus. Diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comparative immunology, microbiology & infectious diseases*, **1994**, 17 : 151-161.

Gourreau J.M. Ecthyma contagieux. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp 445-459.

Greiner E.C., Barber T.C., Pearson J.E., Kramer W.L., Gibbs E.P.J. Orbiviruses from *Culicoides* in Florida. In: Barber T.L., Jochim M.M., eds. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York: Liss, **1985**, pp. 195-200.

Greiner E.C., Knausenberger W.I., Messersmith M., Kramer W.L., Gibbs E.P. *Culicoides* spp. (*Diptera: Ceratopogonidae*) associated with cattle in St. Croix, Virgin

Islands, and their relevance to bluetongue virus. *Journal of medical entomology*, **1990**, 27(6) : 1071-1073.

Grimes J.M., Burroughs J.N., Gouet P., Diprose J.M., Malby R., Zientara S., Mertens P.P., Stuart D.I. The atomic structure of the bluetongue virus core. *Nature*, **1998** 1 ; 395(6701) : 470-478.

Guis H., Tran A., de La Rocque S., Baldet T., Gerbier G., Barragué B., Biteau-Coroller F., Roger F., Viel J.F., Mauny F. Use of high spatial resolution satellite imagery to characterize landscapes at risk for bluetongue. *Veterinary research*, **2007**, 38(5) : 669-683.

Gumm I.D., Newman J.F. The preparation of purified bluetongue virus group antigen for use as a diagnostic reagent. *Archives of Virology*, **1982** ; 72(1-2) : 83-93.

Haig D.A., Mckercher D.G., Alexander R.A. The cytopathogenic action of bluetongue virus on tissue cultures and its application to the detection of antibodies in the serum of sheep. *Onderstepoort journal of Veterinary Research*, **1956**, 27, 171-177.

Hansen S.G., Cope T.A., Hruby D.E. Bizyme: a novel fusion protein-mediating selection of vaccinia virus recombinants by fluorescence and antibiotic resistance. *Biotechniques*, **2002**, 32(5) : 1178-1180.

Hardy J.L., Houk E.J., Kramer L.D.R., Reeves W.C. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*, **1983**, 28, 22-262.

Hassan S.S., Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. *Journal of Virology*, **1999**, 73 : 9832-9842.

Heine H.G., Stevens M.P., Foord A.J., Boyle D.B. A capripoxvirus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32, the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *Journal of immunological methods*, **1999**, 30 ; 227(1-2) : 187-196.

Hewat E.A., Booth T.F., Roy P. Structure of bluetongue virus particles by cryo electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **1992a**, 108, 35-48.

Hewat E.A., Booth T.F., Wade R.H., Roy P. 3-D reconstruction of bluetongue virus tubules using cryoelectron microscopy. *Journal of structural biology*, **1992b**, 108(1) : 35-48.

Holbrook F.R. An overview of Culicoides control. In: *Bluetongue and related Orbiviruses*. New-York: Alan R. Liss. **1985**.

Homan E.J., Mo C.L., Thompson L.H., Barreto C.H., Oviedo M.T. Epidemiologic study of bluetongue viruses in Central America and the Caribbean. *American journal of veterinary research*, **1990**, 51 : 1089-1094.

Howell P.G. A preliminary antigenic classification for strains of bluetongue virus. *Onderstepoort journal of veterinary research*, **1960**, 28(36) : 357-363.

Howell P.G. The antigenic classification and distribution of naturally occurring strains of bluetongue virus. *Journal of South African veterinary medicine association*, **1970**, 41(3) : 215-223.

Huismans H., Els H.J. Characterization of the tubules associated with the replication of three different orbiviruses. *Virology*, **1979**, 30 ; 92(2) : 397-406.

Huismans H., Erasmus B.J. Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort journal of veterinary research*, **1981**, 161, 421-428.

Huismans H., Van Der Walt N.T., Cloete M., Erasmus B.J. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective response in sheep. *Virology*, **1987a**, 157, 172-179.

Huismans H., Van Dijk A.A, Bauskin A.R. *In vitro* phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *Journal of virology*, **1987b**, 157 : 375-386.

Huismans H., Van Dijk A.A. Bluetongue virus structural components. *Current topics in microbiology and immunology*, **1990**, 162, 2141.

Hutcheon D. Fever or epizootic catarrh. *Report of the colonial veterinary surgeon for 1880*, **1881**, 12-15.

Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep. *The veterinary record*, **1902**, 14 : 629-633.

Hyatt A.D., Gould A.R., Coupar B., Eaton B.T. Localization of the non-structural protein NS3/3A protein genes of six bluetongue viruses. *Virus research*, **1991**, 23, 151-161.

Hyatt A.D., Zhao Y., Roy P. Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV non-structural protein NS3/NS3A. *Virology*, **1993**, 193(2) : 592-603.

Inoshima Y., Morooka A., Sentsui H. Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*, **2000**, 84(2) : 201-208.

Iwata H., Yamagawa M., Roy P. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horse sickness, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology*, **1992**, 191(1) : 251-261.

Janardhana V., Andrew M.E., Lobato Z.I., Coupar B.E. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Research in veterinary science*, **1999**, 67(3) : 213-221.

Janeway A., Travers P., Walport M., Shlomchik. Immunobiology. The immune system in Health and disease, Fifth Edition, **2001**, pp.615-617.

Jeggo M.H., Wardley R.C. Production of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus following various immunisation procedures. *Research in veterinary science*, **1982a**, 33(2) : 212-215.

Jeggo M.H., Wardley R.C. Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology*, **1982b**, 45(4) : 629-635.

Jeggo M.H., Wardley R.C. The induction of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus. *Archives of virology*, **1982c**, 71(3) : 197-206.

Jeggo M.H., Gumm I.D., Taylor W.P. Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. *Research in veterinary science*, **1983**, 34(2) : 205-211.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Taylor W.P. Role of neutralising antibody in passive immunity to bluetongue infection. *Research in veterinary science*, **1984a**, 36(1) : 81-86.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J. A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology*, **1984b**, 52(3) : 403-410.

Jeggo M.H., Wardley R.C. Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine*, **1985** ; 3(1): 57-58.

Jeggo M.H., Wardley R.C., Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Progress in clinical & biological Research*, **1985**, 178 : 477-487.

Jennings D.M., Boorman J.P.T., Ergun H. *Culicoides* from western Turkey in relation to bluetongue disease of sheep and cattle. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **1983**, 36 : 67-70.

Johnson E.A., Brown Jr B.W. The spearman estimator for several dilutions assays. *Biometrics*, **1961**, 17, 79-88.

Johnson S., and Roy P. Bluetongue recombinant vaccines. In: *The Proceedings of the 1st Southeast Asia and Pacific Regional Bluetongue Symposium*, Lunming, T.E., St. George, T.E. and P. Kegao, (eds)., **1996**, pp. 192-197.

Johnson D.J., Ostlund E.N., Stallknecht D.E., Goekjian V.H., Jenkins-Moore M., Harris S.C. First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-tailed deer in the United States. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **2006**, 18(4) : 398-401.

Jones L.D., Williams T., Bishop D., Roy P. Baculovirus-expressed non-structural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **1997**, 4(3) : 297-301.

Karaca K., Bowen R., Austgen L.E., Teehee M., Siger L., Grosenbaugh D., Loosemore L., Audonnet J.C., Nordgren R., Minke J.M. Recombinant canarypox vectored West Nile virus (WNV) vaccine protects dogs and cats against a mosquito WNV challenge. *Vaccine*, **2005**, 31 ; 23(29) : 3808-3813.

Kar A.K., Bhattacharya B., Roy P. Bluetongue virus RNA binding protein NS2 is a modulator of viral replication and assembly. *BMC Molecular Biology*, **2007**, 8 : 4.

Katz J.B., Middle L.A. Evaluation of thymidine kinase and neomycin phosphotransferase II positive selection systems for recovery of genetically atypical and recombinant DNA vaccine viruses. *Biologicals*, **1990**, 18, 301-304.

Katz J.B., Alstad A.D., Gustafson G.A., Moser K.M. Sensitive identification of bluetongue virus séroroupe by a colorimetric dual oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acid. *Journal of clinical microbiology*, **1993**, 31(11) : 3028-3030.

Kent S.J., Dale C.J., Ranasinghe C., Stratov I., De Rose R., Chea S., Montefiori D.C., Thomson S., Ramshaw I.A., Coupar B.E., Boyle D.B., Law M., Wilson K.M., Ramsay A.J. Mucosally-administered human-simian immunodeficiency virus DNA and fowlpoxvirus-based recombinant vaccines reduce acute phase viral replication in macaques following vaginal challenge with CCR5-tropic SHIVSF162P3. *Vaccine*, **2005** 10 ; 23 (42) : 5009-5021.

Kieny M.P., Latho R., Drillien R., Spehner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H., Lecocq J.P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature*, **1984**, 312 : 163-166.

Kitching R.P., Hammond J.M., Black D.N. Studies on the major common precipitating antigen of capripox virus. *Journal of general virology*, **1986**, 67 : 139-148.

Kitching R.P., Hammond J.M., Taylor W.P. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Research in veterinary science*, **1987**, 42 : 53-60.

Kitching R.P. Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Developments in biologicals*, **2003**, 114 : 161-167.

Koumbati M., Mangana O., Nomikou K., Mellor P.S., Papadopoulos O. Epidemiologic, observations on bluetongue in sheep in the Marathwada region of Maharashtra state in India. Bluetongue, African horse sickness, and related orbiviruses: *Proceedings of the second international symposium*, **1999**, 193-196.

Kramer W.L., Greiner E.C., Gibbs E.P.J. Seasonal variations in population size, fecundity and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. *Journal of medical entomology*, **1985**, 22 : 163-69.

Ladnyi I.D., Ogorodinkova Z.I., Shelukhina E.M., Gerasimenko R.T., Voronin U.S. Poxvirus circulation among wild rodents in Turkemenia. *Probl. Quarant. Dis.*, **1975**, 3-4 : 165-171.

Le Blois H., French T., Mertens P.P., Burroughs J.N., Roy P. The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. *Virology*, **1992**, 189(2) : 757-761.

Lefèvre P.C. La fièvre catarrhale du mouton. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 667-686.

Lefèvre P.C., Gourreau J.M. Dermatose nodulaire contagieuse. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R. *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Eds Tec & doc. Tome 1, **2003**, pp. 429-443.

Le Goff C., Fakhfakh E., Chadeyras A., Elexpeter A.A., Libeau G., Hammami S., Diallo A., Albina E. Host-range phylogenetic grouping of capripoxviruses - Genetic typing of CaPVs. In: H.P.S. Makkar, G.J. Viljoen (eds), *Applications of Gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries*, **2005**, pp 727-733.

Libeau G., Prehaud C. Lancelot R., Colas F., Guerre L., Bishop D.H. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Research in veterinary science*, **1995**, 58(1) : 50-55.

Linley J.R. Nutrient agar mixtures for culture of food organisms for predaceous *Culicoides* larvae (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **1979**, 16 : 171-172.

Linley J.R. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of non viral animal pathogens. *Journal of medical Entomology*, **1985**, 22 : 589-599.

Linton Y.M., Mordue Luntz A.J., Cruickshank R.H., Meiswinkel R., Mellor P.S., Dallas J.F. Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical and veterinary entomology*, **2002**, 16(2) : 139-146.

Liu X., Kremer M., Broyles S.S. A natural vaccinia virus promoter with exceptional capacity to direct protein synthesis. *Journal of virological methods*, **2004**, 15 ; 122(2) : 141-145.

Lobato Z.I., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Veterinary immunology and immunopathology*, **1997**, 59(3-4) : 293-309.

Lombard M., Pastoret P.P., Moulin A.M. A brief history of vaccines and vaccination. *Revue scientifique et technique (Office international des épizooties)*, **2007**, 26(1) : 29-48.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1982**, 79 : 7415-7419.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *Journal of virology*, **1984**, 857-864.

Mackett M., Smith G.L., Moss B. The construction and characterisation of vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. In: Gover D.M., editor. *DNA Cloning: a practical approach*. Oxford : IRL Press, **1985**, pp: 191-211.

Mackett M., Smith G.L. Vaccinia virus expression vectors. *Journal of general Virology*, **1986**, 67 : 2067-2082.

MacLachlan N.J., Osburn B.I., Stott J.L., Ghalib H.W. Orbivirus infection of the bovine fetus. *Progress in clinical and biological research*, **1985**, 178 : 79-84.

MacLachlan N.J. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infections of ruminants. *Comparative immunology, microbiology & infectious diseases*, **1994**, 17 : 197–206.

Marchal J. Infectious ectromelia. A hitherto underscribed virus disease of mice. *Journal of pathology*, **1930**, 33 : 713-728.

Marennikova S.S., Maltseva N.N., Korneeva V.I., Garinina N.M. Pox outbreaks among carnivore (*Felidae*) and *Edentala*. *Journal of infectious diseases*, **1977**, 135 : 358-366.

Mason J.H., Coles J.D.W.A., Alexander R.A. Cultivation of bluetongue virus in fertile eggs produced on a vitamin-deficient diet. *Nature*, **1940**, 145, 1022.

Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E., Cêtre-Sossah C. Molecular identification of the Western European species of the *Obsoletus* complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an ITS-1 rDNA multiplex PCR assay. *Journal of medical entomology*, **2007**, 44(3):000-000.

Meiswinkel R., Nevil E.M., Venter E.J. Vectors: *Culicoides* spp. In: J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson & R.C. Tustin, eds, *Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa*, Vol. I. Oxford University Press, Cape Town, Chap.5, **1994**, pp 68-89.

Meiswinkel R., Venter G.J., Nevil E.M. Vectors: *Culicoides* spp. In: J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin, eds, *Infectious diseases of livestock*, Oxford University Press, Cape Town, **2004**, pp. 93-136.

Meiswinkel R., Gomulski L.M., Delécolle J.C., Goffredo M., Gasperi G. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes – unfinished business. *Veterinary italiana*, **2004**, 40 (3) : 1-9.

Mellor P.S., Pitzolis G. Observations on breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreak of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of entomological research*, **1979**, 69 : 229-234.

Mellor P.S., Osborne R., Jennings D.M. Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* species in the Sudan. *The journal of hygiene*, **1984**, 93 : 621-628.

Mellor P.S., Jennings D.M., Wilkinson P.J., Boorman J.P.T. *Culicoides imicola* ; a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. *The Veterinary record*, **1985**, 116 : 589-590.

Mellor P.S. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Current topics in microbiology and Immunology*, **1990**, 162 : 101.

Mellor P.S. Climate-change and the distribution of vector-borne diseases with special reference to African horse sickness virus. *Proceeding of international symposium of diagnostic and control of livestock disease*. Vienna, Austria, **1998**, pp. 439-454.

Mellor P.S., Boorman J., Baylis M. *Culicoides* biting midges, their role as arboviruses vectors. *Annual review of entomology*, **2000**, 45 : 307-340.

Mellor P.S., Leake C.J. Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. *Revue scientifique et technique (Office international des épizooties)*, **2000**, 19(1) : 41-54.

Mertens P.P.C., Brown F., Sangar D.V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology*, **1984**, 135 : 207-217.

Mertens P.P.C., Burroughs J.N., Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology*, **1987a**, 157 : 375-386.

Mertens P.P.C., Pedley S., Cowley J., Burroughs J.N., Corteyn A.H., Jeggo M.H., Jennings D.M., Gorman B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid protein VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, **1987b**, 217 : 582-593.

Mertens P.P.C., Pedley S., Cowley J., Burroughs J.N., Corteyn A.H., Jeggo M.H., Jennings A.M., Gorman B.M. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology*, **1989**, 170 : 561-565.

Mertens P.P., Burroughs J.N., Walton A., Wellby M.P., Fu H., O'Hara R.S., Brookes S.M., Mellor P.S. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two Culicoides vector species. *Virology*, **1996**, 15 ; 217(2) : 582-593.

Mertens P.P.C., Attoui H., Duncan R., Dermody T.S. Reoviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. *Virus taxonomy. Eight Report o the International committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, **2005**, 447-454.

Minke J.M., Siger L., Karaca K., Austgen L., Gordy P., Bowen R., Renshaw R.W., Loosmore S., Audonnet J.C., Nordgren B. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Archives of virology, Supplementum*, **2004**, (18) : 221-230.

Mo C.L., Thompson L.H., Homan E.J., Oviedo M.T., Greiner E.C., Gonzalez J. Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. *American journal of veterinary research*, **1994**, 55 : 211-215.

Modrof J., Lymperopoulos K., Roy P. Phosphorylation of bluetongue virus non-structural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *Journal of Virology*, **2005**, 79 : 10023-10031.

Mohammed M.E.H, Taylor W.P. Infection with bluetongue and related orbiviruses in the Sudan detected by the study of sentinel calf herds. *Epidemiology and Infection*, **1987**, 99 : 533-545.

Monaco F., De Luca N., Morelli D., Piscella M., Palmarini S., Di Giandomenico M. Field vaccination of cattle using a bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 9 : effect on milk production. *Veterinary italiana*, **2004**, 40(4) : 661-663.

Moss B. Vaccinia virus: A tool for research and vaccine development. *Science*, **1991**, 252 : 1662-1667.

Moss B. Poxvirus vectors: cytoplasmic expression of transferred genes. *Current opinion in genetics and development*, **1992**, 3(1) : 86-90.

Moss B. Poxviridae: the viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. New York: Lippincott Raven Press, **1996**, pp. 2637-2671.

Moss B., Fenner F. Poxviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. New York: Lippincott Raven Press, **1996**, 2673-2702.

Mullen G.R., Anderson R.R. Transmission of Orbiviruses by *Culicoides* Latreille species (Ceratopogonidae) among cattle and white-tailed deer in the southeastern United States. *International congress of dipterology*, 4th, Oxford, UK, **1998**, pp. 155-156.

Mullens B.A. Tabachnick W.J., Holbrook F.R., Thompson L.H. Effects of temperature on virogenesis of bluetongue virus serotype 11 *Culicoides variipennis sonorensis*. *Medical and veterinary entomology*, **1995**, 9 : 71-76.

Mullens B.A., Velten R.K., Gerry A.C., Braverman Y., Endris R.G. Feeding and survival of *Culicoides sonorensis* on cattle treated with permethrin or pirimiphos-methyl. *Medical and veterinary entomology*, **2000**, 14(3) : 313-320.

Mullens B.A., Gerry A.C., Velten R.K. Failure of a permethrin treatment regime to protect cattle against bluetongue virus. *Journal of Medical Entomology*, **2001**, 38(5) : 760-762.

Muller M.J., Li H. Preliminary results of trapping for *Culicoides* in south China: future bluetongue vector studies. In: St George T.D., Peng K., eds. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR, **1996**, pp. 129-135.

Murray P.K., Eaton B.T. Vaccines for bluetongue. *Australian veterinary journal*, **1996**, 73(6) : 207-210.

Mwangi W., Brown W.C., Lewin H.A., Howard C.J., Hope J.C., Baszler T.V., Caplazi P., Abbott J., Palmer G.H. DNA-encoded foetal liver tyrosine kinase 3 ligand and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor increase dendritic cell recruitment to the inoculation site and enhance antigen-specific CD4+ T cell responses induced by DNA vaccination of outbred animals. *Journal of immunology*, **2002**, 1 ; 169 (7) : 3837-3846.

Neitz W.O. Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort journal of veterinary science*, **1948**, 23 : 96-136.

Nevill E.M., Erasmus B.J., Venter G.J. A six-year survey of viruses associated with *Culicoides* biting midges throughout South Africa (Diptera: Ceratopogonidae). In: Walton T.E., Osburn B.I., eds. *Bluetongue, African Horse Sickness, and Related Orbiviruses*. Boca Raton, FL: CRC, **1992**, pp. 314-319.

Ngichabe C.K., Wamwayi H.M., Ndungu E.K., Mirangi P.K., Bostock C.J., Black D.N., Barrett T. Long term immunity in African cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest virus vaccine. *Epidemiology and infection*, **2002**, 128(2) : 343-349.

Nolan D.V., Carpenter S., Barber J., Mellor P.S., Dallas J.F., Mordue Luntz A.J., Piertney S.B. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus*

and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary microbiology*, **2007**, 20 ; 124(1-2) : 82-94.

OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th Edition.* Paris: Office International des Epizooties, **2004**.

OIE. Bluetongue – Netherlands, Belgium, Germany-OIE. *ProMed*. 21 août **2006**. Accessible sur <http://promedmail.org>, archive no.: 20060821.2353.

OIE. Fièvre catarrhale du mouton en Europe du Nord : un Laboratoire de référence de l'OIE permet une avancée considérable en identifiant le vecteur responsable de la maladie. www.oie.int/eng/press/fr_061023.htm. Octobre **2007**.

Orrù G., Ferrando M.L., Meloni M., Liciardi M., Savini G., De Santis P. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *Journal of virology methods*, **2006**, 137(1) : 34-42.

Pagès N., Sarto I., Monteys V. Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Journal of medical entomology*, **2005**, 42(6) : 1026-1034.

Panicali D., Grzeleccki A., Huang C. Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene*, **1986**, 47 : 193-199.

Paoletti E., Lipinskas B.R., Samsanoff C., Meror S., Panicali D. Construction of live vaccinia viruses using genetically engineered poxvirus: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein, *Proceeding of National Academy of Science*, **1984**, 81 : 193-197.

Parker J., Herniman K.A.J., Gibbs E.P.J., Sellers R.F. An experimental inactivated bluetongue virus vaccine against bluetongue virus. *The veterinary record*, **1975**, 96 : 284.

Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Thomas I., Paquot A., Baudouin B., Kieny M.P., Lecocq J.P., Debruyne J., Costy F., Antome H., Desmettre P. First field trial of fox vaccination against rabies with a vaccinia-rabies recombinant virus. *The veterinary record*, **1988**, 123 : 481.

Pastoret P.P., Brochier B. Development of a recombinant vaccinia-rabies vaccine for oral vaccination of foxes against rabies. *Developments in biological standardization*, **1992**, 79 : 105-111.

Pastoret P.P., Brochier B., Languet B., Duret C., Chappuis G., Desmettre P. Stability of recombinant vaccinia-rabies vaccine in veterinary use. *Developments in biological standardization*, **1996**, 87 : 245-259.

Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P., Verschueren C. Technical basis of vaccination, part 4. Routes of vaccination. In: *Veterinary vaccinology*, **1997**, pp. 525-528.

Pastoret P.P., Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases*, **2003**, 26 : 343-355.

Paweska J.T., Venter G.J., Mellor P.S. Vector competence of South African Culicoides species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Medical and veterinary entomology*, **2002**, 16(1) : 10-21.

Pedley S., Mohamed M.E.H., Mertens P.P.C. Analysis of the genome segments of six different bluetongue virus isolates using RNA-RNA hybridisation: A generalised coding assignment for bluetongue viruses. *Virus research*, **1988**, 10 : 381-390.

Perkus M.E., Piccini A., Lipinskas B.R., Paoletti E. Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science*, **1985**, 229 : 981-984.

Perkus M.E., Goebel S.J., Davis S.W., Johnson G.P., Norton E.K., Paoletti E. Deletion of 55 open reading frames from the termini of vaccinia virus. *Virology*, **1991**, 180 : 406-410.

Perrin A., Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and veterinary entomology*, **2006**, 20(2) : 219-228.

Perrin A., Albina E., Bréard E., Sailleau C., Promé S., Grillet C., Kwiatek O., Russo P., Thiéry R., Zientara S., Cêtre-Sossah C. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, **2007**, 17; 25(37-38) : 6774-6783.

Piccini A., Perkus M.E., Paoletti E. Vaccinia virus as an expression vector. *Methods in enzymology*, **1987**, 153 : 545-563.

Pierce C.M., Rossitto P.V., Maclachlan N.J. Homotypic and heterotypic neutralization determinants of bluetongue virus serotype 17. *Virology*, **1995**, 209 : 263-267.

Purrini K., Kohring G. W., Seguni Z. Studies on a new disease in a natural population of Migratory Locust, *Locusta migratoria* sp. Caused by an entomopox virus. *Journal of invertebrate pathology*, **1988**, 51 : 281-283.

Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature: reviews in microbiology*, **2005**, 3(2) : 171-181.

Purse B.V., Nedelchev N., Georgiev G., Veleva E., Boorman J., Denison E., Veronesi E., Carpenter S., Baylis M., Mellor P.S. Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. *Medical and veterinary entomology*, **2006** 20(3) : 335-344.

Rigby P.W.J. Cloning vectors derived from animal viruses. *Journal of general virology*, **1983**, 64 : 255-266.

Roberts D.H. Bluetongue: a review. *State veterinary journal*, **1990**, 44(124) : 66-80.

Romero C.H., Barrett T., Evans S.A., Kitching R.P., Gershon P.D., Bostock C., Black D.N. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine*, **1993**, 11(7) : 737-742.

Romero C.H., Barrett T., Chamberlain R.W., Kitching R.P., Fleming M., Black D.N. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology*, **1994**, 204(1) : 425-429.

Roy P., Fukusho A., Ritter D.G., Lyons D. Evidence for genetic relationship between RNA and DNA viruses from the sequence homology of a putative polymerase gene of bluetongue virus with that of vaccinia virus: conservation of RNA polymerase gene from diverse species. *Nucleic acids research*, **1988**, 16 : 11759-11767.

Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structures. *Virus research*, **1989**, 13 : 179-206.

Roy P., Adachi A., Urakawa T., Booth T.F., Thomas C.P. Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. *Journal of virology*, **1990a**, 64(1) : 1-8.

Roy P., Urakawa T., Van Dijk A.A., Erasmus B.J. Recombinant virus vaccine for Bluetongue disease in sheep. *Journal of virology*, **1990b**, 64 : 1998-2003.

Roy P. A novel (third generation) candidate vaccine developed for Bluetongue disease of sheep. *Agriculture biotechnology news and information*, **1991**, 3 : 993-998.

Roy P. Bluetongue virus proteins. *Journal of general virology*, **1992a**, 73 : 3051-3064.

Roy P. From genes to complex structures of Bluetongue virus and their efficacy as vaccines. *Veterinary microbiology*, **1992b**, 33 : 155-168.

Roy P., Erasmus B.J. Second generation candidate vaccine for Bluetongue disease. In: *Bluetongue, African Horsesickness and Related Orbiviruses*, Walton T.E., and Osburn B.I., eds., CRC Press, Inc, USA., **1992**, pp. 856-867.

Roy P., French T.J., Erasmus B.J. Protective efficacy of virus-like particles for Bluetongue disease. *Vaccine*, **1992**, 10 : 28-32.

Roy P. Genetically engineered Bluetongue virus-like particles and their potential for vaccine in sheep. In: *Veterinary vaccines*, Hogland and Pandey, eds., Springer-Verlag, Heidelberg, **1993**, 4 : 29-53.

Roy P., Bishop D.H.L., LeBlois H., Erasmus B.J. Long-lasting protection of sheep against Bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine*, **1994a**, 12 : 805-811.

Roy P., Callis J., Erasmus B.J. Protection of sheep against Bluetongue disease after vaccination with core-like and virus-like particles: Evidence for homologous and partial heterologous protection. In: *Proceeding for 97th Annual Meeting, USA Health Association*, Las Vegas, Nevada, USA. **1994b** pp. 88-97.

Roy P. Synthesis of particulate structures as Bluetongue virus vaccine and their use as multiple immunogen delivery systems. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, **1995**, 93 : 3-20.

Sabin A.B. Reovirus. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science*, **1959**, 20 : 1387-1389.

Sanchez-Puig J.M., Blasco R. Puromycin resistance (pac) gene as a selectable marker in vaccinia virus. *Gene*, **2000**, 57-65.

Sarver N., Gruss P., Law M.F., Khoury G., Howley P.M. Bovine papilloma virus deoxyribonucleic acid: a novel eukaryotic cloning vector. *Molecular and cellular biology*, **1981**, 1 : 486-496.

Savini G., Monaco F., Facchinei A., Pinoni C., Salucci S., Cofini F. Field vaccination of sheep with bivalent modified-live vaccine against bluetongue virus serotypes 2 and 4 : effect on milk production. *Veterinary italiana*, **2004**, 40(4) : 627-630.

Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., de Santis P., Meiswinkel R., Caporale V. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the Obsoletus complex (Culicoides, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *The veterinary record*, **2005**, 30 ; 157(5) : 133-139.

Savini G., MacLachlan N.J., Calistri P., Sanchez-Vizcaino J.M., Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **2007a**, in press.

Savini G., Ronchi G.F., Leone A., Ciarelli A., Migliaccio P., Franchi P., Mercante M.T., Pini A. An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Veterinary microbiology*, **2007b**, 124 : 140-146.

Sellers R.F., Gibbs E.P.J., Herniman K.A.J., Pedgley D.E., Tucker M.R. Possible origin of the bluetongue epidemic in Cyprus. *The journal of hygiene*, **1979**, 83 : 547-555.

Sellers R.F. Weather, host and vector – Their interplay in the spread of insect borne animal virus diseases. *The journal of hygiene*, **1980**, 85 : 65-102.

Sellers R.F. Bluetongue and related diseases. In: Gibbs E.P.J. ed. *Virus Diseases of Food Animals*. London, UK: Academic Press, **1981**, pp. 567-584.

Sellers R.F., Maarouf A.R. Trajectory analysis and bluetongue virus serotype 2 in Florida in 1982. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **1989**, 53 : 100-102.

Sellers R.F., Mellor P.S. Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides spp.* during adverse conditions. *Revue scientifique et technique* (Office Internationale des Epizooties), **1993**, 12(3) : 733-755.

Sendow I., Sukarsih D., Soleha E., Pearce M., Bahri S., Daniels P.W. Bluetongue virus research in Indonesia. In: St George TD, Peng K, eds. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR, **1996**, pp. 28-32.

Sharifah S.H., Ali M.A., Gard G.P., Polkinghorne I.G. Isolation of multiple serotypes of bluetongue virus from sentinel livestock in Malaysia. *Tropical animal health and production*, **1995**, 27(1) : 37-42.

Shaw A.E., Monaghan P., Alpar H.O., Anthony S., Darpel K.E., Batten C.A., Guercio A., Alimena G., Vitale M., Bankowska K., Carpenter S., Jones H., Oura C.A.L., King D.P., Elliott H., Mellor P.S., Mertens P.P.C. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *Journal of virology methods*, **2007**, doi:10.1016/j.jviromet.2007.05.014.

Shimotohno K., Temin H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene onto DNA of an avian retrovirus. *Cells*, **1981**, 26 : 67-77.

Singer R.S., MacLachlan N.J., Carpenter T.E. Maximal predicted duration of viraemia in bluetongue virus-infected cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, **2001**, 13 : 43-49.

Skinner M.A., Laidlaw S.M., Eldaghayes I., Kaiser P., Cottingham M.G. Fowlpox virus as a recombinant vaccine vector for use in mammals and poultry. *Expert review of vaccines*, **2005**, 4 : 63-76.

Smith G.L., Mackett M., Moss B. Recombinant vaccinia viruses as new live vaccines. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, **1984**, 2 : 383-407.

Sollai G., Solari P., Masala C., Crnjar R., Liscia A. Effects of avermectins on olfactory responses of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of medical entomology*, **2007**, 44(4) : 656-659.

Solnick D. Construction of an adenovirus SV40 recombinant producing SV40 T-antigen from an adenovirus late promoter. *Cells*, **1981**, 24 : 135-143.

Spreull J. Report from veterinary surgeon Spreull on the result of his experiments with the malarial catarrhal fever of sheep. *Agricultural journal of the cape of good hope*, **1902**, 20 : 469-477.

Spreull J. Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of comparative pathology*, **1905**, 18 : 321-337.

Standfast H.A., Dyce A.L., Muller M.J. Vectors of bluetongue virus in Australia. In: Barber T.L., Jochim M.M., eds. *Bluetongue and Related Orbiviruses*. New York: Liss. **1985**, pp. 177-186.

Stäuber N., Martinez-Costas J., Sutton G., Monastyrskaya K., Roy P. Bluetongue virus VP6 protein binds ATP and exhibits an RNA-dependent ATPase function and a helicase activity that catalyze the unwinding of double-stranded RNA substrates. *Journal of virology*, **1997**, 71(10) : 7220-7226.

Stevens D.R. Stott J., Osburn B.I., Giles R., Wieseahn G.P., Barber T.L. Potency and efficacy of inactivated bluetongue virus vaccines. *Progress in clinical biological research*, **1985**, 178 : 649.

Stevceva L., Alvarez X., Lackner A.A., Trynieszewska E., Kelsall B., Nacsa J., Tartaglia J., Strober W., Franchini G. Both mucosal and systemic routes of immunization with the live, attenuated NYVAC/simian immunodeficiency virus SIV (gpe) recombinant vaccine result in gag-specific CD8 (+) T-cell responses in mucosal tissues of macaques. *Journal of virology*, **2002**, 76 (22) : 11659-11676.

Stewart A.J., Devlin P.M. The history of the smallpox vaccine. *The Journal of infection*, **2006**, 52(5) : 329-334.

Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L. The current status of research on an experimental inactivated bluetongue virus vaccine. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*, **1979**, 83 : 55.

Stott J.L., Osburn B.I., Barber T.L. Immunologic response of sheep to inactivated vaccine against bluetongue virus. *American journal of veterinary research*, **1985**, 46 : 1043.

Sukarsih D., Daniels P.W., Sendow I., Soleha E. Longitudinal studies of *Culicoides* spp. associated with livestock in Indonesia. In: Uren MF, Kay BH, eds., *Arbovirus Research in Australia, 6th, Brisbane*, Brisbane: CSIRO/QIMR, **1993**, pp. 203-209.

Sukarsih D., Sendow I., Bahri S., Pearce M., Daniels P.W. *Culicoides* survey in Indonesia. In: St George T.D., Peng K., eds., *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*. Canberra: ACIAR, **1996**, pp. 123-128.

Tabachnick W.J. Genetics, population genetics and evolution of *Culicoides variipennis*: implications for bluetongue virus transmission in the USA and its international impact. In: Walter T.E, Osburn B.I., eds., *Bluetongue, African Horse sickness and related orbiviruses*. Boca Rata, FL: CRC, **1992**, pp. 262-270.

Tabachnick W.J., Holbrook F.R. The *Culicoides variipennis* complex and the distribution of the bluetongue viruses in the United States. *Proceedings of United States Animal Health Association*, **1992**, 96 : 207-212.

Tan B.H., Nason E., Staeuber N., Jiang W., Monastyrskaya K., Roy P. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *Journal of virology*, **2001**, 75 : 3937-3947.

Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P.C., Kirkham P.A., Burroughs J.N., Parkhouse R.M.E. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of general virology*, **2003**, 84 : 227-235.

Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk-) deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *Journal of general virology*, **1991**, 72 : 125-130.

Taylor W.P. The epidemiology of bluetongue. *Revue scientifique et technique* (Office international des épizooties), **1986**, 5 : 351-356.

Theiler A. Bluetongue in sheep. *Annual Report of the Director of Agriculture, Transvaal for 1904-1905*, **1906**, 110-121.

Theiler A. The inoculation of sheep against bluetongue and the results in practice. *The Veterinary journal*, **1908**, 64 : 600-607.

Theron J., Uitenweerde J.M., Huismans H., Nel L.H. Comparison of the expression and phosphorylation of the non-structural protein NS2 of three different orbiviruses: evidence for the involvement of an ubiquitous cellular kinase. *Journal of general virology*, **1994**, 75 : 3401-3411.

Thiry E., Saegerman C., Guyot H., Kirten P., Losson B., Rollin F. Bluetongue in northern Europe. *The veterinary record*, **2006**, 159 : 327.

Thomas C.P., Booth T.F., Roy P. Synthesis of bluetongue virus-encoded phosphoprotein and formation of inclusion bodies by recombinant baculovirus in insect cells: it binds the single-stranded RNA species. *Journal of general virology*, **1990**, 71 : 2073-2083.

Thummel C., Tjian R., Grodzicker T. Expression of SV40 T-antigen under control of adenovirus promoters. *Cells*, **1981**, 23 : 825-836.

Timiryasova T.M., Chen B., Fodor N., Fodor I. Construction of recombinant vaccinia viruses using PUV-Inactivated Virus as a helper. *Biotechniques*, **2001**, 31 : 534-540.

Toma B., Bénet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F. & Sanaa M. Glossaire d'épidémiologie animale. *Le Point vétérinaire*, Maisons-Alfort, **1991**.

Toussaint J.F., Sailleau C., Mast J., Houdart P., Czaplicki G., Demeestere L., VandenBussche F., Van Dessel W., Goris N., Bréard E., Bounaadja L., Thiry E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue in Belgium, 2006. *Emerging Infectious disease*, **2007a**, 13(4) : 614-616.

Toussaint J.F., Sailleau C., Bréard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of virological methods*, **2007b**, 140(1-2) : 115-123.

Tulman E. R., Afonso C. L., Lu Z., Zsak L., Kutish G. F., Rock D. L. Genome of Lumpy Skin Disease Virus. *Journal of virology*, **2001**, 75(15) : 7122-7130.

Urakawa T., Ritter D.G., Roy P. Expression of the largest RNA segment and synthesis of VP1 protein of bluetongue virus in insect cells by recombinant baculovirus: association of VP1 protein with RNA polymerase activity. *Nucleic acids research*, **1989**, 17 : 7395-7401.

Urakawa T., French T.J., Adachi Y., Fukusho A., LeBlois H., Flamand M., Mertens P., Roy P. Synthesis of recombinant baculoviruses expressing the outer capsid protein VP2 of five BTV serotypes and the induction of neutralizing antibodies to homologous and heterologous BTV serotypes. *Virus Research*, **1994**; 31(2) : 149-161.

Urbano P., Urbano F.G. The Reoviridae family. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, **1994**, 17 : 151-161.

Venter G.J., Meiswinkel R. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the Orange

Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. *Onderstepoort journal of veterinary research*, **1994**, 61 : 327-340.

Venter G.J., Paweska J.T., Van Dijk A.A., Mellor P.S., Tabachnick W.J. Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotypes 1, 3 and 4. *Medical and veterinary entomology*, **1998**, 12 : 378-385.

Venter G.J., Gerdes G.H., Mellor P.S., Paweska J.T. Transmission potential of South African *Culicoides* species for live-attenuated bluetongue virus. *Veterinary italiana*, **2004**, 40 : 198-202.

Verwoerd D.W. Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology*, **1969**, 38 : 203-212.

Verwoerd D.W., Erasmus B.J. Bluetongue. In: Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustion R.C., eds. *Infectious Diseases of Livestock with special reference to Southern Africa*. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, **1994**, pp. 443-459.

Wade-Evans A.M., Romero C.H., Mellor P., Takamatsu H., Anderson J., Thevasagayam J., Fleming M.J., Mertens P.P., Black D.N. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology*, **1996**, 220(1) : 227-231.

Walker A.R., Davies F.G. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya. *The journal of hygiene*, **1971**, 69 : 47-60.

Wallace D.B., Viljoen G.J. Importance of thymidine kinase activity for normal growth of lumpy skin disease virus (SA-Neethling). *Archives of virology*, **2002**, 147(3) : 659-663.

Wallace D.B., Viljoen G.J. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of LSDV generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine*, **2005**, 23 : 3061-3067.

Wallace D.B., Ellis C.E., Espach A., Smith S.J., Greyling R.R., Viljoen G.J. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine*, **2006**, 30 ; 24 : 49-50.

Wallace D.B., Weyer J., Nel L.H., Viljoen G.J. Improved method for the generation and selection of homogeneous lumpy skin disease virus (SA-Neethling) recombinants. *Journal of virological methods*, **2007**, doi:10.1016/j.jviromet.2007.06.004.

Wei C.W., Gibson M., Spear P.G., Scolnick E.M. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*, **1981**, 39 : 935-944.

Welter J., Taylor J., Tartaglia J., Paoletti E., Stephensen C.B. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *Journal of virology*, **2000**, 74 (14) : 6358-6367.

White D.M., Wilson W.C., Blai C.D., Beaty B.J. Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of general virology*, **2005**, 86 : 453-462.

Wieser-Schimpf L., Wilson W.C., French D.D., Baham A., Foil L.D. Bluetongue virus in sheep and cattle and *Culicoides variipennis* and *C. stellifer* (Diptera: Ceratopogonidae) in Louisiana. *Journal of medical entomology*, **1993**, 30(4) : 719-724.

Wirth, W.W., Hubert, A.A. The *Culicoides* of Southeast Asia (Diptera: Ceratopogonidae). *Memoirs of the american entomological institute*, **1989**, 44, 1-508.

Wittmann E.J. Temperature and the transmission of arboviruses by *Culicoides*. PhD thesis. **1999**, University of Bristol, Bristol.

Wittmann E.J., Mellor P.S., Baylis M. Effect of temperature on the transmission of orbiviruses by the biting midge, *Culicoides sonorensis*. *Medical and veterinary entomology*, **2002**, 16 : 147-156.

Wu X., Chen S.Y., Iwata H., Compans R.W., Roy P. Multiple glycoproteins synthesized by the smallest RNA segment (S10) of bluetongue virus. *Journal of virology*, **1992**, 66(12) : 7104-7112.

Xu G., Wilson W., Mecham J., Murphy K., Zhou E.M., Tabachnick W. VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in *Culicoides variipennis*. *Journal of general virology*, **1997**, 78 : 1617-1623.

Yeruham I., Perl S., Nyska A., Abraham A., Davidson M., Haymovitch M., Zamir O., Grinstein H. Adverse reactions in cattle to a capripox vaccine. *The veterinary record*, **1994**, 135(14) : 330-332.

Zavala F., Rodrigues M., Rodriguez D., Rodriguez J.R., Nussenzweig R.S., Esteban M. A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of *in vivo* expansion of primed CD8 (+) T cells. *Virology*, **2001**, 280(2) : 155-159.

Zenner F. Le cycle trophogonique de *C. nubeculosus*, *C. riethi* et *C. obsoletus*. Contribution à l'étude de sa physiologie et des conséquences écologiques et épidémiologiques. Thèse de Doctorat en Médecine (Diplôme d'Etat), UPL, **1977**, N°4 : 220 p.

Zhang N., MacLachlan N.J., Bonneau K.R., Zhu J., Li Z. Identification of seven serotypes of bluetongue virus from the People's Republic of China. *The veterinary record*, **1999**, 9 ; 145(15) : 427-429.

Zheng M., Liu Q., Jin N., Guo J., Huang X., Li H., Zhu W., Xiong Y. A duplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Capripoxvirus and Orf virus. *Molecular and cellular probes*, **2007**, 21(4) : 276-281.

Zientara S., De la Rocque S., Gourreau J.M., Gregory M., Diallo A., Hendrix P., Libeau G., Sailleau C., Delécolle J.C. La Fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidémiologie et santé animale*, **2000**, 38 : 133-144.

Zientara S., Gourreau J.M. La fièvre catarrhale du mouton. *Virologie*, **2001**, 5 : 449-451.

Zientara S., Sailleau C., Dauphin G., Roquier C., Rémond E.M., Lebreton F., Hammoumi S., Dubois E., Agier C., Merle G., Bréard E. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *The veterinary record*, **2002**, 150(19) : 598-601.

Zientara S., Sailleau C., Cêtre-Sossah C., Bounaadja L., Bréard E., Gerbier G., Baldet T., Albina A. Le nouveau praticien vétérinaire, **2006**, (9) : 1-7.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées

Gènes (numéro d'accèsion Genbank)	Amorces	Position en 5' (par rapport à la séquence référéncée Genbank)	Séquences	Température d'hybridation
NS1 BIV-2 (AY138895)	NS1-F1	1 pb	5'-AgATTggATgATTCTCTTTACgC-3'	51°C
	NS1-F2	651 pb	5'-CTgTggTgATTgATgTACGC-3'	53°C
	NS1-R1	723 pb	5'-TCTTCgATCTTCACCGTCTTg-3'	52°C
	NS1-R2	1659 pb	5'-gCAATTTggCgATATCTCgA-3'	58°
NS3 BIV-2 (AF481093)	NS3-F1	1 pb	5'-gTTAAAAAgTgTCgCTgCCATgGTATC-3'	60°C
	NS3-R1	647 pb	5'-ATCTTAaggTTAAATggTAATTCgAAA-3'	50°C
VP2 BIV-2 (AF356601)	VP2-F1	1 pb	5'-ATggATgAACTTggCAATTCg-3'	56°C
	VP2-F2	1313 pb	5'-TTACCCTAgAgAggCAATCCTTg-3'	56°C
	VP2-R1	1524 pb	5'-CTATTCAgCTTCgTATCCTTTTCg-3'	54°C
	VP2-R2	2559 pb	5'-CCgCACACTgATgAgATAgATgT-3'	56°C
	VP2-R3	2906 pb	5'-ACCTgCAgTCACgCaggTCA-3'	64°C
VP3 BIV-2 (AY124371)	VP3-F1	1 pb	5'-ATGGCTGCTCAGAAATGAGCAAC-3'	56°C
	VP3-F2	1310 pb	5'-ATGACTGTAAATGTTTTTAgAGCAGATT-3'	53°C
	VP3-R1	1401 pb	5'-TGCACATAAGGAGCTGGATCTC-3'	54°C
	VP3-R2	2729 pb	5'-AAGTGCATAGATTGGTCGCACA-3'	55°C
	VP3-R3	353 pb	5'-ACATCTCCAACTCGCGACATCTCT-3'	58°C
VP7 BIV-2 (AF481095)	VP7-F1	1 pb	5'-ATGGACACTATCGCGCAAGAGCA-3'	63 °C
	VP7-R1	1050 pb	5'-CTACACATAAGCGCGCGGCAAT-3'	67°C
	VP7-Spel-R	1050 pb	5'-GGAGTCTACACATAAGCGCGCGCA-3'	66°C*
	NotI-pilI-VP7-F	1 pb	5'-AAGAAATGCGGCGGCTATTAAAGTTATAAAATGAACTTAA	
			ATGGACACTATCGCGCAAGAGC-3'	61°C*
β-Actine (BT030480)	β-Act-1*	932 pb	5'-CCAgACAgCACTgTgTgC-3'	54 °C
	β-Act-2*	670 pb	5'-gAgAAgCTgTgCTACgTCgC-3'	53°C
Thymidine Kinase (D00423)	CPTK9*	373 pb	5'-TCCTATAAAATATACTAAATAAACAATAAAC-3'	46°C
	CPTK10*	1063 pb	5'-CAAAACAgATTTATATTTTTCCTTACCC-3'	53°C

* Pour le calcul des températures d'hybridation, on ne tient pas compte des queues flottantes identifiées en caractères gras.

* Position en 5' à partir de la première base de la séquence référéncée.

Annexe 2 : Liste des publications

Article 1:

Perrin A., Albina E., Bréard E., Sailleau C., Promé S., Grillet C., Kwiatek O., Russo P., Thiéry R., Zientara S., Cêtre-Sossah C. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine*, **2007**, 25:6774-6783.

Article 2:

Albina E., Zientara S., Sailleau C., Perrin A., Cêtre-Sossah C., Bréard E., Grillet C. La fièvre catarrhale ovine (*bluetongue*): quand une maladie du sud s'invite au nord. *Virologie*, **2007**, 11:1-13.

Article 3:

Mathieu B., Perrin A., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E., Cêtre-Sossah C. Molecular identification of western european species of *Obsoletus* complex (*Diptera: Ceratopogonidae*) by an international transcribed spacer-1 rDNA multiplex polymerase chain reaction assay. *Journal of medical entomology*, **2007**, sous presse.

Article 4:

Perrin A., Cêtre-Sossah C., Mathieu B., Baldet T., Delécolle J.C., Albina E. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and veterinary entomology*, **2006**, 20(2):219-28.

Article 5:

Cêtre-Sossah C., Baldet T., Delécolle J.C., Mathieu B., Perrin A., Grillet C. Albina E. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary research*, **2004**, 35:325-337.



Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: Evaluation of immune responses and protection in small ruminants

Aurélien Perrin^a, Emmanuel Albina^a, Emmanuel Bréard^b, Corinne Sailleau^b, Sylvie Promé^a,
Colette Grillet^a, Olivier Kwiitek^a, Pierre Russo^c, Richard Thiéry^c,
Stephan Zientara^b, Catherine Cêtre-Sossah^{a,*}

^a CIRAD-Département BioS, UPRI5, TA A-15, Campus International de Baillarguet, 34398 Cedex 5 Montpellier, France

^b AFSSA-INRA-ENVA, UMR 1161, 23 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France

^c AFSSA-Unité Pathologie des Petits Ruminants, 105 Route des Chappes, BP111, 06902 Sophia Antipolis, France

Received 14 February 2007; received in revised form 10 May 2007; accepted 22 June 2007

Available online 16 July 2007

Abstract

The development of recombinant capripoxviruses for protective immunization of ruminants against bluetongue virus (BTV) infection is described. Sheep ($n=11$) and goats ($n=4$) were immunized with BTV recombinant capripoxviruses (BTV-Cpox) individually expressing four different genes encoding two capsid proteins (VP2 and VP7) and two non-structural proteins (NS1, NS3) of BTV serotype 2 (BTV-2). Seroconversion was observed against NS3, VP7 and VP2 in both species and a lymphoproliferation specific to BTV antigens was also demonstrated in goats. Finally, partial protection of sheep challenged 3 weeks after BTV-Cpox administration with a virulent strain of BTV-2, was observed.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bluetongue; Capripoxvirus; Vaccine

1. Introduction

The development of poxviruses as vectors for producing recombinant vaccines is well documented [1–3]. Although vaccinia virus (VV) was the first and most extensively developed poxvirus vector, concerns over its use in immunocompromised persons and its broad host-range specificity had led to the search for alternative poxviruses which might prove more suitable vectors. Attenuated strains of lumpy skin disease virus (LSDV) and sheeppox virus (SPV), both members of the *Capripoxvirus* genus [4], have been used effectively as vaccines for many years. A live attenuated strain of LSDV, Kenya Sheep-1 (KS-1), has been used as a vaccine to control sheeppox [5]. More recently this strain and the South

African vaccine strain of LSDV have been developed as vectors for multivalent recombinant vaccines against livestock diseases such as rinderpest, Peste des Petits Ruminants and Rift Valley fever [6–12]. Diseases caused by capripoxviruses in sheep, goats and cattle are economically important in large areas of Africa and Asia. Both sheeppox and goatpox are endemic in Africa, the near East, South and East Asia while lumpy skin disease is spread over most Africa but absent from Asia [13,14]. Capripoxviruses are therefore potentially ideal poxvirus vectors for the development of recombinant multivalent vaccines to enable delivery of antigens from other ruminant pathogens that share the same geographical distribution. Another important infectious, non-contagious viral disease of ruminants present in the Mediterranean basin and northern Africa is bluetongue (BT) [15,16]. Bluetongue virus (BTV) is thought to infect all known species of ruminants. Severe disease usually occurs only in certain breeds of sheep,

* Corresponding author. Tel.: +33 467593724; fax: +33 467593798.

E-mail address: catherine.cetre-sossah@cirad.fr (C. Cêtre-Sossah).

particularly the fine wool and mutton breeds and some species of deer, most notably the North American white-tailed deer [17]. However, recent outbreaks due to serotype 8 occurred in northern Europe in both sheep and cattle [18]. Clinical signs may include fever, depression, excessive salivation, nasal discharge, facial oedema, hyperaemia, ulceration of the oral mucosa and death. Unimproved indigenous sheep, cattle and goats are usually highly resistant to the clinical effects of infection and therefore the vast majority of BTV episodes throughout the world are completely silent [17,19]. The virus, consisting of 24 different serotypes, is transmitted between its vertebrate hosts by few species of biting midges of the *Culicoides* genus (Diptera: Ceratopogonidae) [20]. BTV is a double-stranded RNA virus within the genus *Orbivirus* of the family *Reoviridae* [21]. The virion consists of a core containing 10 segments of dsRNA [22,23] that encode 7 structural (VP1 to VP7) and 4 non-structural proteins (NS1 to NS3/NS3A). The outer capsid is made up of two major structural proteins, VP2 and VP5 (segments 2 and 5, respectively), involved in cell attachment and virus entry. VP2 is known to contain the major neutralization determinant of BTV and VP5 influences virus neutralization through its conformational interaction with VP2 [24]. Inner capsid is made of two major structural proteins VP3 and VP7 (encoded by segments 3 and 7, respectively) and three distinct minor proteins (VP1, VP4 and VP6 corresponding to segments 1, 4 and 9 respectively) [25]. Four other non-structural proteins, produced during the viral cycle (NS1, NS2 and NS3/NS3A) (segments 6, 8 and 10), are more conserved among serotypes [26].

Previous studies involving coexpression of VP2 and VP5 as virus-like particles (VLPs) or in combination with core proteins [27–29] confirmed the viability of a subunit BTV vaccination strategy. However, these vaccines have not yet been adopted for field use and only the live attenuated vaccines that confer serotype-specific protection have been widely used to prevent bluetongue in livestock, including the recent epidemic in the Mediterranean basin [30]. However, several authors [31–36] have described side-effects resulting from the residual pathogenicity of live attenuated vaccines against BTV. A recent study using recombinant capripox virus coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 induced high level of protection in sheep but still remains serotype specific [37]. Both the product of virus neutralizing antibodies and the activation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) have been shown to have a role in protective immunity. CTLs have been demonstrated to be sufficient to clear the virus from infected hosts. BTV infection has previously been shown to induce BTV-specific CTLs in both sheep and mice [38,39], and their effect was shown to be maximal around 14 days post immunization (PI) [40]. Mice immunized with a single BTV type were shown to produce CTLs which were cross-reactive with a number of BTV [41]. The genes VP2 and NS1 are described to be major CTL immunogens [28] and the genes VP3, VP5 and VP7 shown to be less immuno-dominant [42,43]. A previous study has demonstrated a significant protective immune response with

a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against homologous challenge [44] with a potential role of CTLs in conferring partial heterotypic immunity to BTV infection in sheep [45]. Lobato et al. [27] demonstrated that a BTV-VP5 recombinant vaccinia virus can induce antibodies and partial protection. This protection is improved when both recombinant VP2 and VP5 are associated. In this study, recombinant capripoxviruses (BTV-Cpox), expressing VP2 derived from BTV serotype 2, or the conserved VP7, NS1 and NS3 proteins, were developed in order to induce at least homologous protection. These BTV-Cpox recombinants were administered to goats and sheep and immune responses were evaluated in both species. Sheep were also challenged with a pathogenic BTV serotype 2.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of BTV genes and generation of capripoxviruses

The four distinct full-length BTV genes NS1, NS3, VP7 and VP2 corresponding to segments 6, 10, 7 and 2, respectively were amplified from a Corsican strain of BTV-2 [46] and inserted into pFastBAC-HTA (Invitrogen, USA) (for NS1, NS3 and VP7) and in TOPO-XL (Invitrogen, USA) (for VP2). These four genes were individually subcloned into pKSCATpSGPT, a shuttle plasmid designed in the laboratory from a pBluescript II KS backbone for homologous recombination in the capripoxvirus vector [6]. All BTV genes were placed under the control of the early/late synthetic promoter (PS) from vaccinia virus (generous gift from Dr. Drillien, University of Strasbourg, France). The *Escherichia coli* xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene (*Eco*gpt), also under control of the PS promoter, but in the opposite orientation, was used as a dominant selectable marker to isolate the recombinants [47,48]. The insertion site in the capripoxvirus genome was the viral thymidine kinase (TK) gene [49–51]. All plasmids were amplified in *E. coli* Top10 competent cells (Stratagene, USA), and purified under endotoxin free conditions using the Endofree plasmid maxi kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions.

Gene expression (Fig. 1) was then checked in transient expression assays in lamb testis cells (OA3Ts) co-infected with parental virus, KS-1. Recombinants were then generated in OA3Ts as described previously [9], but using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) in place of Lipofectine.

To test the expression of BTV proteins by the recombinant capripoxviruses, monolayers of OA3Ts cells were infected and fixed after 48 h with cold acetone for 30 min at -20°C . Polyclonal antibodies against BTV proteins were added for 1 h at 37°C , followed by fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit anti-goat immunoglobulin G (IgG) incubation. Viral supernatants resulting from capripoxvirus-infected cells transfected with the insertion vector were used to select recombinants in the presence of the *Eco* gpt selection

Table 1
Primers used for the PCR detection of BTV-Cpox recombinants

Primers	Sequences	<i>T_m</i> (°C)
CPTK9	5'-TCCTATAAATATACTAAATAACAAATAAC-3'	46
CPTK10	5'-CAAACA _g ATTATATTTTCCTTACCC-3'	53
BTV-VP2-F1	5'-ATggATgAACTTCgTATCCTTTTCg-3'	56
BTV-VP7-F1	5'-CgCgCAATCgCACgTgTAAg-3'	64
BTV-NS1-F1	5'-AgATTgATgATTCTCTTTCAgC-3'	51
BTV-NS3-F1	5'-gTAAAAA _g TgTCgCTgCCATgCTATC-3'	60

medium containing mycophenolic acid (MPA) [10]. After the development of cytopathic effects (CPE), two sequential rounds of plaque purification followed by end-point dilutions were carried out to purify recombinant viruses from parental viruses. To confirm the nature and the purity of our clones, a PCR-based method was adopted. For this purpose, several sets of primers (Table 1) were designed to detect recombinant and/or parental viruses: BTV-2 gene-specific primers (VP2-BTV2 F1, VP7-BTV2 F1, NS1-BTV F1, and NS3-BTV F1) and capripoxvirus TK gene-specific primers (CPTK9/CPTK10). Viral DNA was extracted from viral suspension using Qiamp DNA MiniKit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. Specific recombinant capripoxvirus PCR reactions were performed in a total volume of 50 μ l consisting of 10 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 μ M of each dNTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer (CPTK9/BTV2-F1), and 2.5 U Taq

DNA polymerase (Qiagen, USA) under the following thermocycling conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min; then 30 cycles [94 °C, 1 min; between 50 and 56 °C depending of the sequences to amplify; 72 °C, between 1 and 4 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. A volume of 5 μ l of viral DNA was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide. Recombinant and parental viruses were amplified by using primers CPTK9/CPTK10. Reactions were performed as previously described with the following thermocycling conditions: an initial denaturation stage at 94 °C for 5 min; then 30 cycles [94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 1 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. Table 2 summarizes the expected sizes of the different PCR products used to define the nature and purity of each BTV-Cpox recombinant construct.

2.2. Capripoxvirus immunization and BTV challenge

BTV challenges were performed in goats with a vaccinal strain of BTV-2, passaged on Vero cells and in sheep with a blood source wild-type serotype 2 strain (generous gift from Merial, France).

2.2.1. Experiment 1

Two groups of four Saanen goats were purchased from a western French region free of BTV infection and housed in an insect proof stabling facility. Animals which were seronegative for both viruses (capripoxvirus and BTV) were individually immunized subcutaneously (day 0) with either a suspension of 2×10^6 TCID₅₀ of negative control recombinant capripox-HPPR vaccine expressing the haemagglutinin

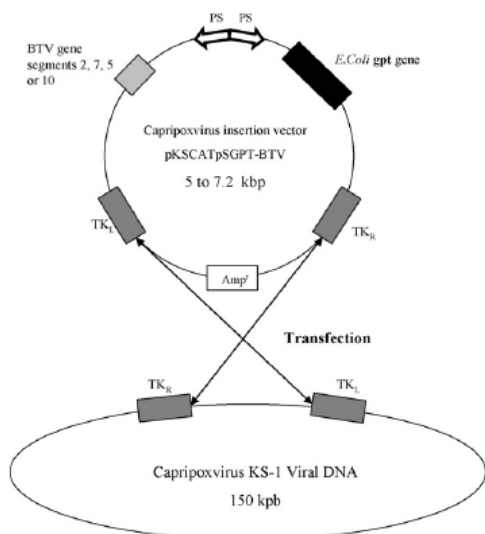


Fig. 1. Insertion of the BTV genes into the TK gene of the attenuated capripoxvirus strain, KS-1. The capripoxvirus DNA insertion vector, pKSCATpSGPT consists of the KS-1 thymidine kinase gene (TK) disrupted by a multiple cloning site (MCS) where the four full-length BTV genes have been individually inserted (under control of the VV early/late synthetic promoter, PS), the *E. coli* gpt is a dominant selectable marker gene (also under control of the VV promoter, but in the opposite orientation). Arrows indicate the direction of transcription of the VV promoters.

Table 2
Expected PCR product sizes of BTV-Cpox recombinants and KS-1 parental strain

	PCR product length (bp)	
	CPTK9/CPTK10	CPTK9/F1
Recombinants		
BTV-VP2	4361	3194
BTV-VP7	2461	1338
BTV-NS1	3061	1947
BTV-NS3	2161	1353
KS-1 attenuated strain	714	–

of the peste des petits ruminants virus (PPRV) [6] or with 2×10^6 TCID₅₀ of each BTV-Cpox recombinant construct. Three weeks after immunization (day 21), all animals were challenged subcutaneously with 10^4 TCID₅₀ of the BTV-2 attenuated vaccine strain. One goat in the control group died from metabolic disorders before the immunization. EDTA whole blood was collected for RNA extraction at days 21, 23, 25, 28 and heparinised whole blood for PBMC isolation at days 0, 7, 14, 28, 35, 42 post immunization. Serum for antibody detection was collected immediately prior to immunization and at weekly intervals.

2.2.2. Experiment 2

Twenty-one Pré-Alpes sheep purchased from a eastern French region free of BTV infection were divided into 2 groups of 10 and 11 sheep and were housed in a level 3 stabling facility. Animals from each group were individually immunized subcutaneously (day 0) with either a suspension of 2×10^6 TCID₅₀ of recombinant capripox-HPPR vaccine (negative control group) or with 2×10^6 TCID₅₀ of each BTV-Cpox recombinant construct (BTV-Cpox group). Three weeks after inoculation (day 21), all animals were challenged subcutaneously with 10^4 TCID₅₀ of the virulent BTV-2 strain. They were observed daily for the appearance of clinical signs which were used collectively to give a final severity score for each animal: overall behaviour (good, 0pt; apathy, 1pt; prostration, 2pts; recumbence, 3pts), clinical signs (oedema [facial, 1pt, nasal, 1pt, mandibular, 1pt, lips, 1pt, tongue, 1pt]; skin or hoof congestion, 4pts; locomotion difficulties [stiffness, 2pts, limp, 2pts]; respiratory problems [mild discharge, 1pt, severe nasal discharge, 2pts, cough, 1pt]; digestive problems, 1pt; others [conjunctivitis, 1pt, oral ulcers, 1pt, plaintive bleating, 1pt, hypersalivation, 1pt]), death, 20 pts. The score given for one animal in Fig. 4 corresponds to the total number of points accumulated during the experiment (from the day of the challenge [day 42] till the day of euthanasia [day 76]) divided by the number of days this animal presented clinical signs. EDTA whole blood was collected for RNA extraction at days 21, 25, 28 days post immunization and sera were collected at weekly intervals.

2.3. Antibody assays

Serum antibodies to BTV-VP7/NS1/NS3, BTV/VP2, haemagglutinin H of PPRV and capripoxvirus were detected by indirect ELISA, virus neutralization test (VNT), competitive ELISA and IFA, respectively.

2.3.1. BTV-(VP7/NS1/NS3) antibody detection by indirect ELISA

Polysorp plates (Nunc, USA) were coated with either VP7 or NS1 or NS3 baculovirus expressed proteins diluted 1/50 in PBS (50 µl per well) and incubated overnight at 4 °C. Plates were then saturated with blocking buffer (PBS-Tween 20 0.05%, BSA 1% and skimmed milk 3%). The animal sera, diluted 1/100 in blocking buffer, were added and incu-

bated for 45 min at 37 °C. After four washes in PBS-Tween 20–0.05%, plates were incubated for 45 min at 37 °C with an anti-goat-HRP secondary antibody (P0163, Dako, USA) at a 1/6000 dilution in blocking buffer. Finally, after four washes, the reaction was developed with 100 µl of substrate solution (1 mg of *o*-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma, USA) per millilitre, 0.03% H₂O₂) and stopped by the addition of 100 µl of sulphuric acid (1 M). Results were expressed as optical densities (ODs) measured at 492 nm. Values obtained from the different sera samples during the course of the experiment were compared to day 0. Values were considered significant when ODs were higher than the mean value plus two-standard deviations of ODs at day 0.

2.3.2. BTV-VP2 antibody detection by VNT

Duplicates of three-fold serial dilutions of sera starting from 1:5 were added to 100 TCID₅₀ of BTV serotype 2 into 96-well microtitre plates and incubated for 1 h at 37 °C. Then 100,000 Vero cells were added to each well and the plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 5–6 days. Titers were expressed as the inverse highest dilutions giving 50% of CPE. Sera with titers higher than 10 were considered to be positive.

2.3.3. H-PPR antibody detection using ELISA

Antibody responses to H-PPR were measured using a competitive ELISA as described by Libeau et al. [52].

2.3.4. Capripoxvirus antibody detection using IFA

OA3Ts cells seeded in microtitre plates were infected with the KS-1 strain at a multiplicity of infection (moi) of 0.25 pfu per cell. 48 h later at 37 °C, 5% CO₂, the cells were fixed with 80% acetone for 30 min at –20 °C. All test sera, diluted 1/50, were added in duplicate and incubated for 30 min at 37 °C. Fluorescein-conjugated anti-goat, or anti-sheep, serum (F0250 and F0135, respectively—Dako, USA) was added at a dilution of 1/50 and incubated for a further 30 min at 37 °C. Readings were performed using an inverted epifluorescence microscope (Nikon, eclipse TE300). Positive and negative controls were included in the test.

2.4. Antigen specific lymphoproliferation assay in goats

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from heparinized venous blood. Isolation of sheep PBMCs was performed but lymphoproliferation assays could not be achieved due to technical problems. Only data on goats are presented in this paper. Blood diluted 1:3 in PBS was centrifuged at RT at 3000 rpm for 30 min over Histopaque 1083 (Sigma, USA). Cells collected at the interface were washed three times in PBS and labelled with cell trace carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, USA). They were then resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), amphotericin B (250 µg/ml) and L-glutamin

(2 M) (Sigma, USA) and seeded in round-bottom microtitre plates. Different UV-inactivated viral suspensions (KS-1 and BTV-2) were appropriately diluted and added to the wells as antigen preparations. Negative and positive controls for lymphoproliferation consisted of RPMI and Concanavalin A (ConA, 5 µg/ml, Sigma, USA), respectively. PBMCs were collected after 4 days of incubation at 37 °C and analyzed for blastogenesis and proliferation by flow cytometry using a FACsort and cellQuest 3.01 software package (Becton Dickinson, USA). Forward (FSC) and side (SSC) scatter dot plots were used to exclude dead cells (lower left events) and to estimate lymphoblastic cells (upper-rightward displacement of events). Lymphoproliferative cells were estimated as events with reduced green fluorescence on an FL1xFSC dot plot.

2.5. Detection of BTV in blood

EDTA-whole blood from goats was collected on the day of the challenge (day 21) and at days 2, 4 and 7 post-challenge corresponding to days 23, 25 and 28 PI, whereas EDTA-whole blood from sheep was collected at days 21, 25 and 28 PI. All blood samples were stored at –80 °C until required. BTV detection using RT-PCR was performed directly on blood. However, none of the goats challenged with an attenuated and cell culture-adapted BTV-2 strain presented viraemia detectable by RT-PCR. Then, blood samples of goats were inoculated onto Vero cells and incubated for 6 days as previously described [53] and RT-PCR detection was subsequently performed on clarified supernatants of frozen/thawed cells. RNA from blood was extracted by Trizol method as described in Toussaint et al. [54], whereas RNA from cell supernatant was extracted using the RNeasy tissue kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was performed using the "first-strand cDNA synthesis" Kit (Amersham Biosciences, UK) according to manufacturer's instructions. NS1 gene was amplified by RT-PCR using primers 11–31 and 284–265 [55]. Reactions were performed in a total volume of 50 µl consisting in 10× PCR reaction buffer, 250 µM of each dNTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer,

and 2.5 U Taq DNA polymerase (Qiagen, USA) under the following thermocycling conditions: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles [94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min, 72 °C, 1 min] and a final extension step at 72 °C for 10 min. A volume of 10 µl of cDNA was added to each RT-PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination.

2.6. Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used to compare ODs obtained from the NS3 and VP7 ELISAs between the control and BTV-Cpox groups. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Clinical scores obtained for sheep were compared using the Kruskal–Wallis test. Significance of the lymphocyte proliferation data was performed using the student t test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Generation of recombinant capripoxviruses

In order to evaluate the expression of the BT recombinant proteins from their respective insertion vectors in transfected cells, transient expression studies using IFA were performed. Fluorescence was visualized on lamb testis (OA3Ts) cells infected with the VP7-Cpox recombinant but not on cells infected with the wild-type KS-1 strain. Recombinants were then generated and selected in the presence of the *E. coli* gpt selection medium containing mycophenolic acid as described previously [10].

The purity of the BTV-Cpox recombinant viruses was confirmed by the absence of detectable parental virus (KS-1) using a PCR performed directly on DNA extracted from the viral supernatant and targeting the TK gene. Fig. 2 presents PCR products obtained from samples collected at different steps in the procedure of selection. As shown on Fig. 2a, two specific bands corresponding respectively to parental KS-1 DNA (714 bp) and the recombinant Cpox VP7 DNA (2461 bp) were obtained from a clone from the first round of

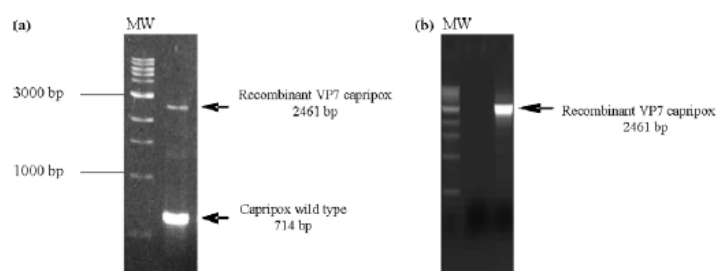


Fig. 2. PCR amplification of recombinant virus. Agarose gel electrophoresis showing PCR products (using the CPTK9/CPTK10 primer pair) of BTV-VP7 recombinant capripoxvirus and KS-1 before selection (a) and after selection (b). MW corresponds to a 1 kb DNA ladder (Biolabs, UK).

Table 3
Detection of BTV antibodies

ELISA/VNT	Days post-immunization				
	0	14	21	28	35
NS3					
Control group	0.152 ± 0.013 0/10	0.118 ± 0.011 0/10	0.126 ± 0.024 1/10	0.128 ± 0.022 1/10	0.364 ± 0.065 7/7
BTV-Cpox group	0.133 ± 0.025 0/11	0.188 ± 0.054* 6/11	0.206 ± 0.068* 8/11	0.208 ± 0.06* 8/11	0.564 ± 0.015* 10/10
VP7					
Control group	0.045 ± 0.005 0/10	ND	0.087 ± 0.016 0/10	0.154 ± 0.083 5/10	0.215 ± 0.067 7/7
BTV-Cpox group	0.06 ± 0.019 0/10	ND	0.126 ± 0.056* 4/11	0.156 ± 0.062 8/11	0.471 ± 0.061* 10/10
VP2					
Control group	0 0/10	ND	0 0/10	4 3/10	472 6/7
BTV-Cpox group	0 0/11	ND	9.55* 3/11	11.82* 6/11	760* 9/10

Animal sera were tested at different time points before and after BTV challenge (day 21). Results (mean ± 2 OD) are expressed in OD values for NS3 and VP7; results (mean) are expressed in titers for VP2. 6/11 means seroconversion of 6 animals out of 11. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant. ND: not determined.

selection. A single band at 2461 bp was obtained for the same clone after further rounds (Fig. 2b).

3.2. Immunogenicity of BTV-Cpox vaccine in goats and sheep

In both animal experiments, kinetic analysis of BTV and Cpox antibodies was performed in serum samples collected weekly over a 7-week period PI. Antibodies to capripoxvirus, as revealed by IFA, were detected as early as 2 weeks PI in some animals and at 1 week PI in all animals (whether immunized with control HPPR-Cpox or BTV-Cpox viruses).

Three different ELISAs were used to analyze anti-NS3, anti-VP7 or anti-NS1 antibodies whereas VNT was used for anti-VP2 antibody detection. Since both goats and sheep gave similar results, only the sheep results are presented in this paper. A NS3 seroconversion was observed as early as 1 week PI for 6 animals out of 11, and for 8 animals out of 11 at day 21 (3 weeks PI) in the BTV-Cpox group compared to the control animals which only seroconverted at day 35; that is 2 weeks after the virulent challenge (Table 3). VP7 seroconversion was observed in four animals inoculated with the BTV-Cpox recombinant at 3 weeks PI (day 21) and for the remainder of the group at 2 weeks post BTV challenge (day 35). The boost in the VP7 antibody response at day 35 (Table 3) correlated with the anti-NS3 boost observed in the BTV-Cpox group animals. OD values of the BTV-Cpox group were significantly different from those of the control group.

Due to limitations of the technique used, anti-NS1 antibody detection could not be interpreted. Anti-VP2 antibodies were detected by virus neutralization testing (VNT) the day of the challenge (day 21) in 3 animals out of 11 in the BTV-Cpox

group. Three more animals seroconverted one week later and by day 35, 9 out of the 10 had seroconverted (1 sheep died between days 28 and 35). Titers of the BTV-Cpox group were significantly different from the values of the control group at days 21, 28 and 35 ($p < 0.05$). As expected, animals immunized with HPPR-Cpox seroconverted to HPPR, whereas those immunized with BTV-Cpox did not seroconvert (data not shown).

3.3. Cell-mediated immunity in goats

Antigen-specific blastogenesis and lymphocyte proliferation were monitored at weekly intervals after the attenuated BTV challenge.

A BTV-specific proliferation was first observed at day 14 for the four animals of the BTV-Cpox group. A significant effect was observed for the four animals included in the BTV-Cpox group at day 28 (1 week PI) compared to the control group (Fig. 3a). No significant BTV-specific lympho-proliferation was obtained, as expected, in the control group at any time point (Fig. 3a). A Cpox-specific lympho-proliferation was observed at day 28 (4 animals out of 4), and from day 28 (4/4) to day 42 (3/4) for the BTV-Cpox group (Fig. 3b). Surprisingly, a specific Cpox proliferation was obtained only at day 42 (3 animals out of 3) for the animals in the control group (Fig. 3b). This low level and delayed response of Cpox-specific proliferation in control group animals may be due to the fact they were immunized with a dose 4 times lower than the BTV-Cpox group animals (2.10^6 TCID₅₀ versus $2 \times 4 \times 10^6$ TCID₅₀). Specific blastogenesis (BTV and Cpox) and lympho-proliferation (BTV and Cpox) gave similar results (data not shown).

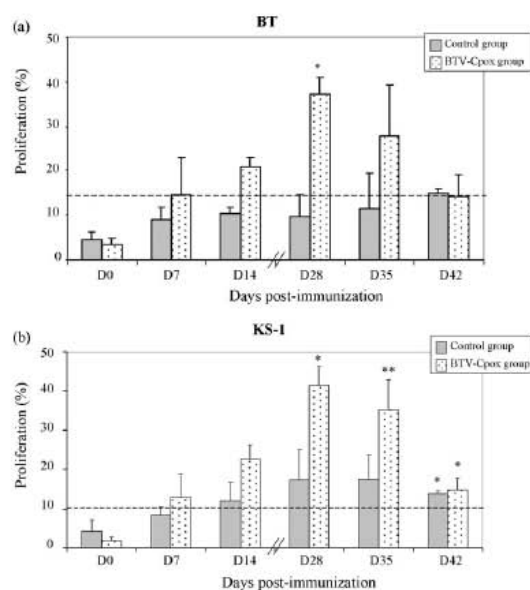


Fig. 3. Lymphocyte proliferation assay of BTV-Cpox vaccinated goats. PBMCs isolated from either the control group or the BTV-Cpox group were stimulated with whole inactivated BTV antigen (a) and whole inactivated KS-1 antigen (b) for 4 days. The resulting proliferation was determined by CFSE incorporation. The dotted-line corresponds to the mean of proliferation observed for cells alone. Significance was performed using the Student *t*-test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant.

3.4. Protection studies

The ability of BTV-Cpox vaccines to protect sheep and goats against disease and virus replication was evaluated by scoring clinical signs after virulent BTV-2 challenge and by detection of BTV, respectively (Table 4). One animal out of 11 died at day 55 in the BTV-Cpox group whereas 3 animals out of 10 died at days 53, 54 and 58 in the negative control group (inoculated with H-PPR Cpox vaccine and challenged with virulent BTV). Results presented in Fig. 4 are total scores which include mortality (20 points) obtained for each animal. A significant difference was observed between the two groups using the Kruskal–Wallis test with a p -value < 0.001 . Two out of 11 animals in the BTV-Cpox group did not present any clinical signs whereas 4 of them presented mild clinical signs after the BTV challenge with a value below 3. All animals from the control group, except one, presented total scores higher than three.

Detection of BTV genome was performed at days 21, 23, 25, 28 PI to evaluate the presence of the virus in the blood of BTV-Cpox inoculated and challenged animals. BTV genome was not detected directly in goats' bloods. However, it could be detected after virus enrichment on VERO cells. Animals which received the H-PPR Cpox vaccine (negative control group) had detectable levels of virus genome in their blood at 2, 4, and 7 days post-challenge whereas no RT-PCR specific

Table 4
Detection of BTV in blood samples

Goats		Days post-immunization				
		21	23	25	28	
(a)	Control group	#3015	—	+	+	+
		#6105	—	+	+	+
		#7031	—	+	+	+
	BTV-Cpox group	#8020	—	—	—	—
		#9008	—	—	—	—
		#9022	—	—	—	—
		#9034	—	—	—	—
	Sheep	Days post-immunization				
		21	25	28		
	(b)	Control group	#14	—	—	+
#16			—	+	+	
#22			—	+	+	
#23			—	+	+	
#32			—	+	+	
#33			—	+	+	
#46			—	+	+	
#58			—	+	+	
#87			—	+	+	
#90			—	+	+	
BTV-Cpox group		#2	—	—	—	
		#12	—	—	+	
		#18	—	+	+	
		#31	—	+	+	
		#34	—	—	+	
		#48	—	+	+	
		#50	—	+	+	
		#73	—	—	+	
		#92	—	+	—	
		#95	—	—	+	
#96	—	+	—			

(a) Represents CPE observed at different time points for experiment 1 whereas (b) represents RT-PCR results expressed as positive and negative for BTV detection for experiment 2.

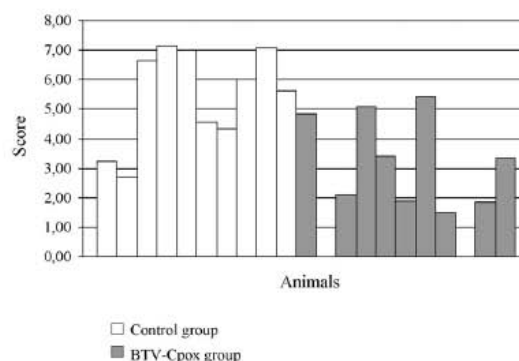


Fig. 4. Scores of clinical signs. Clinical signs including mortality were scored for each animal of the experiment 2. Statistical analysis was performed by Kruskal–Wallis test. A value of $p < 0.05$ (*) was considered significant.

amplification was detectable in the BTV-Cpox group animals (Table 4a). For sheep, all the animals in the control group except 1, and 5 out of 11 in the BTV-Cpox group, had virus genome in their blood at day 4 post-challenge. However, by day 7 post-challenge 8 sheep out of 11 in the BTV-Cpox group and all the sheep in the control group were positive for BTV genome (Table 4b).

4. Discussion

Live-attenuated (LA) BT vaccines have been used to vaccinate sheep to protect against epizootics of BT disease. These vaccines which have proved to be very effective, are however serotype-specific and therefore require regular injections with appropriate strains to protect against different BTV serotypes. LA BT vaccines may also cause adverse effects owing to incomplete attenuation. Development of alternative vectored vaccines expressing conserved protective antigens and increasing their presentation to the immune system in contrast to natural infection would reduce the number of multi-serotype vaccinations required and still provide a cost-effective product. The aim of this study was to generate and evaluate BT-recombinant capripoxviruses as vaccines. cDNA of complete coding sequences of various BTV serotype 2 genes (NS1, NS3, VP2 and VP7) were introduced into the thymidine kinase gene of the Kenya Sheep (KS-1) vaccine strain of capripoxvirus. The transgenes were selected according to the results of previous studies with the objective of including the most immunogenic and/or conserved BTV proteins. A previous study demonstrated a significant protective immune response with a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against a homologous challenge [44]. The VP2 and NS1 proteins are described to be major CTL immunogens [29] while VP3, VP5, VP7 proteins were shown to be less immuno-dominant [42,43]. Moreover, BTV-NS2 protein has been shown to generate CTL in mice [56]. However, due to persistent difficulties in cloning the NS2 protein, we were not able to include this antigen in our approach. Finally, NS3 was selected because it is highly conserved between different serotypes. The synthesis of BTV proteins for each recombinant expression vector was confirmed by IFA using the appropriate anti-sera. Four individually cloned BTV recombinants expressing the four distinct proteins of BTV (NS1, NS3, VP2 and VP7) were produced. Antibody and cell-mediated immune responses to those recombinants were evaluated in two animal experiments. The first experiment with goats was designed to evaluate the immunogenicity of these recombinants and also to what extent the conferred immunity could interfere with the replication of a LA BTV-2 virus. The second experiment in sheep was used to assess the protective immunity conferred by the recombinants against a virulent BTV-2 challenge.

In both goats and sheep, seroconversion to NS3, VP2 and VP7 was observed prior to BTV challenge. However,

a boosting effect of BTV challenge was seen in all animals pre-immunized with the BT-recombinant capripoxviruses. In addition, all animals mounted a specific antibody response to capripoxvirus. These results demonstrate the capacity of the capripoxvirus to elicit an immune response in sheep and goats both against the virus and the expressed transgenes. The partial seroconversion observed 3 weeks after immunization is not critical *per se* since in another model, goats with limited antibody formation after vaccination with a recombinant capripoxvirus expressing the PPRV haemagglutinin or fusion proteins, were still fully protected against a virulent PPRV challenge [6,7]. Antibody responses against BTV-NS1 could not be demonstrated with our in-house technique. However, since NS1 expression *in vitro* by the recombinant capripoxvirus was evidenced by mRNA production, the possibility of an anti-NS1 immune response in those animals cannot be ruled out. Antigen-specific blastogenesis and proliferation of goat lymphocytes after *in vitro* restimulation with whole inactivated BTV confirmed the immunogenicity of the recombinant BTV-capripoxviruses delivered to the animals. Unexpectedly, the level of the lymphocyte response to capripoxvirus antigens was significantly different between goats immunized with BTV-Cpox and HPPR-Cpox. This difference is assumed to result from a dose effect between control animals which received a dose of 2×10^6 TCID₅₀/ml and BTV-Cpox animals which received a total dose of 8×10^6 TCID₅₀/ml.

The protective effect of the vectored vaccines against BT was assessed in sheep. Only a partial protection could be observed since several animals developed clinical signs and one animal died. Scored clinical signs between the BTV-Cpox group and the control group were however significantly different ($p < 0.05$). Nevertheless, our results do not correspond with those of Wade-Evans et al. [44] who demonstrated a significant protective immune response with a BTV-VP7 recombinant capripoxvirus via a cell-mediated mechanism against homologous challenge showing that a VP7 recombinant capripoxvirus using the same KS-1 vaccine strain as vector did induce good protection against homotypic virulent challenge and partial protection against a heterotypic challenge. The reasons for this disparity are not yet understood.

The relatively low protection induced in this study, even when four different BTV antigens were co-delivered, might be due to various reasons, including insufficient levels of protein expression, immune stimulation or inadequate immune responses. Alternatively, immunoprotective responses might be not achievable when individual proteins are co-delivered but are not self-associating to form an antigenic hetero-oligomer such as a virus-like particle. A recombinant canarypoxvirus vaccine coexpressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of BT was recently shown to induce high levels of protection in sheep against a homologous challenge, presumably because these two proteins self-associate to make a virus-like outer capsid [37]. However, the use of VP2 and VP5 may not induce protection against a heterotypic virulent challenge.

Marker vaccines for BT in Mediterranean and North African countries are an important issue since a high percentage of the sheep population is seropositive for BTV, although not showing disease. There is thus a need for a vaccine allowing for discrimination of infected and vaccinated animals (DIVA) through the development of a companion test based on ELISAs using antigens specific to the vaccine or to the wild-type virus. BTV-Cpox constructs with improved efficacy would be ideal candidates to provide DIVA vaccines and tests since they would only express some of the BTV genes and thus vaccinated animals would lack antibodies to other viral proteins, which are present in animals recovering from natural infection. The potential use of Cpox-vectored recombinant constructs as dual vaccines in hosts other than cattle (for LSDV) is supported by the high level of Cpox-neutralizing antibodies obtained in goats and sheep. As the three members of the capripoxvirus genus (SPV, goatpox, LSDV) are closely related it is possible to use heterospecific viruses for inducing protection in all ruminants [57] and there is evidence that LSDV replicates in both sheep and goats.

Acknowledgments

The authors would like to thank Noël Richard, Jean-Michel Guibert, Pascal Morel and Valérie Balcer-Rodrigues for technical assistance and Merial for providing the BTV-2 wild type virus. This research was supported in part by the Région Languedoc Roussillon, France and the French Ministry of Foreign Affairs (MAE) through the FSP project LABOVET 2003–24.

References

- [1] Fries LF, Tartaglia J, Taylo J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, et al. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 1996;14(5):428–34.
- [2] Karaca K, Sharma JM, Winslow BJ, Junker DE, Reddy S, Cochran M, et al. Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine* 1998;16(16):1496–503.
- [3] Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 1983;302(5908):490–5.
- [4] Le Goff C, Fakhfakh E, Chadeyras A, Adulugba EE, Libeau G, Hammami S, et al. Host range phylogenetic grouping of capripoxviruses. In: Makkar HPS, Viljoen GJ, editors. *Applications of Gene-Based Technologies for improving animal production and health in developing countries*. IEAA; 2005. p. 727–33.
- [5] Kitching RP, Hammond JM, Taylor WP. A single vaccine for the control of capripox infection in sheep and goats. *Res Vet Sci* 1987;42(1):53–60.
- [6] Berhe G, Minet C, Le Goff C, Barrett T, Ngangnou A, Grillet C, et al. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against Peste-des-Petits-Ruminants Virus and Capripoxvirus infections. *J Virol* 2003;77(2):1571–7.
- [7] Diallo A, Minet C, Berhe G, Le Goff C, Black DN, Fleming M, et al. Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann N Y Acad Sci* 2002;969:88–91.
- [8] Ngichabe CK, Wamwayi HM, Barrett T, Ndungu EK, Black DN, Bostock CJ. Trial of a capripoxvirus-rinderpest recombinant vaccine in African cattle. *Epidemiol Infect* 1997;118(1):63–70.
- [9] Ngichabe CK, Wamwayi HM, Ndungu EK, Mirangi PK, Bostock CJ, Black DN, et al. Long term immunity in African cattle vaccinated with a recombinant capripox-rinderpest virus vaccine. *Epidemiol Infect* 2002;128(2):443–9.
- [10] Romero CH, Barrett T, Evans SA, Kitching RP, Gershon PD, Bostock C, et al. Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease. *Vaccine* 1993;11:737–42.
- [11] Romero CH, Barrett T, Kitching RP, Carn VM, Black DN. Protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease with a recombinant capripoxvirus expressing the fusion protein gene of rinderpest virus. *Vet Rec* 1994;135:152–4.
- [12] Wallace DB, Ellis CE, Espach A, Smith SJ, Greyling RR, Viljoen GJ. Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever. *Vaccine* 2006;24(49–50):7181–9.
- [13] Davies FG. Sheep and goatpox. In: Gibbs EPJ, editor. *Virus disease of food animals*, vol. 2. London: Academic press; 1981. p. 7333–48.
- [14] Davies FG. Lumpy skin disease, an African capripox disease in cattle. *Br Vet J* 1991;147:489–502.
- [15] Baylis M, Mellor PS. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. *Vet Rec* 2001;649:659.
- [16] Mellor PS, Wittmann EJ. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Vet Rec* 2002;164:20–37.
- [17] MacLachlan NJ. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994;17(3–4):197–206.
- [18] Thiry E, Saegerman C, Guyot H, Kirten P, Losson B, Rollin F, et al. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec* 2006;159(10):327.
- [19] Mellor PS, Bluetongue. *State Vet J* 1994;4:7–10.
- [20] Mellor PS, Boorman J, Baylis M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 2000;45:307–40.
- [21] Mellor PS, Boorman J. The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Ann Trop Med Parasitol* 1995;89(1):1–15.
- [22] Gould AR, Hyatt AD. The *Orbivirus* genus, diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994;17:163–88.
- [23] Roy P. Bluetongue virus genetics and genome structure. *Virus Res* 1989;13(3):179–206.
- [24] DeMaula CD, Bonneau KR, MacLachlan NJ. Changes in the outer capsid proteins of BTV serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus Res* 2000;67:59–66.
- [25] Verwoerd DW. Purification and characterization of bluetongue virus. *Virology* 1969;38(2):203–12.
- [26] Verwoerd DW, Els HJ, De Villiers EM, Huisman H. Structure of the Bluetongue Virus capsid. *J Virol* 1972;10(4):793–4.
- [27] Lobato ZIP, Coupar BEH, Gray CP, Lunt R, Adrew EM. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigen. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:293–309.
- [28] Roy P, French T, Erasmus BJ. Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine* 1992;10:28–32.
- [29] Roy P, Bishop DH, Leblois H, Erasmus BJ. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles: evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994;12:805–11.
- [30] Dunga B, Gerdes T, Smit T. The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Vet Ital* 2004;40:616–22.
- [31] Hunter P, Modumo J. A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 2001;68(4):331–3.

- [32] Murray PK, Eaton BT. Vaccines for bluetongue. *Aust Vet J* 1996;73(6):207–10.
- [33] Ferrari G, De Liberato C, Scavia G, Loenzetti R, Zini M, Farina M. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype 2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Vet Med* 2005;68:103–13.
- [34] MacLachlan NJ, Osburn BI, Stott JL, Ghalib HW. *Orbivirus* infection of the bovine fetus. *Prog Clin Bio Res* 1985;178:79–84.
- [35] Schultz G, Delay PD. Losses in newborn lambs associated with bluetongue vaccination of pregnancy ewes. *J Am Vet Med Assoc* 1955;127(942):224–6.
- [36] Young S, Cordy DR. An ovine fetal encephalopathy caused by Bluetongue vaccine virus. *J Neuropathol Exp Neurol* 1964;23:635–59.
- [37] Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, Audonnet JC, Yao J, He L, et al. Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* 2007;25(4):672–8 [Epub 2006 Sep 5].
- [38] Jeggo MH, Wardley RC. The induction of murine cytotoxic T lymphocytes by bluetongue virus. *Arch Virol* 1982;71(3):197–206.
- [39] Takamatsu H, Jeggo MH. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology* 1989;66:258–63.
- [40] Jeggo MH, Wardley RC, Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res* 1985;178:477–87.
- [41] Jeggo MH, Wardley RC. Generation of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes following immunization of mice with various bluetongue virus types. *Immunology* 1982;45(4):629–35.
- [42] Janardhana V, Andrew ME, Lobato ZI, Coupar BE. The ovine cytotoxic T lymphocyte responses to bluetongue virus. *Res vet Sci* 1999;67(3):213–21.
- [43] Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, Coupar B. Antigen specific of the ovine cytotoxic T Lymphocytes response to bluetongue virus. *Vet immunol immunopathol* 1995;47(3–4):311–22.
- [44] Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor PS, Takamatsu H, Anderson J, Thevasagayam J, et al. Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 1996;220(1):227–31.
- [45] Stott JL, Osburn BI. Immune response to bluetongue virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990;162:163–78.
- [46] Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond EM, Lebreton F et al. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* 2002;150:598–601.
- [47] Boyle DB, Coupar AEH. A dominant selectable marker for the construction of recombinant poxviruses. *Gene* 1988;65:123–8.
- [48] Falkner FG, Moss B. *Escherichia coli* gpt gene provides dominant selection for vaccinia virus open reading frame expression vectors. *J Virol* 1988;62:1849–54.
- [49] Dubbs DR, Kits S. Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in TK inducing activity. *Virology* 1964;22:214–25.
- [50] Boyle DB, Coupar AEH, Both GW. Multiple-cloning-site plasmids for the rapid construction of recombinant poxviruses. *Gene* 1985;35(1–2):169–77.
- [51] Wallace DB, Viljoen GJ. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of LSDV generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine* 2005;23:3061–7.
- [52] Libeau G, Prehaud C, Lancelot R, Colas F, Guerre L, Bishop DH, et al. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res Vet Sci* 1995;58(1):50–5.
- [53] Clavijo A, Heckert RA, Dulac G, Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus. *J Virol Methods* 2000;87:13–23.
- [54] Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 2007;140(1–2):115–23.
- [55] Katz JB, Alstad AD, Gustafson GA, Moser KM. Sensitive identification of bluetongue virus serogroup by a colorimetric dual oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acid. *J Clin Microbiol* 1993;31(11):3028–30.
- [56] Jones LD, Williams T, Bishop D, Roy P. Baculovirus-expressed non-structural protein NS2 of bluetongue virus induces a cytotoxic T-cell response in mice which affords partial protection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;59(34):293–309.
- [57] Kitching RP, Taylor WP. Clinical and antigenic relationship between isolates of sheep and goat pox viruses. *Trop Anim Health Proc* 1985;17(2):64–74.

La fièvre catarrhale ovine (*bluetongue*) : quand une maladie du sud s'invite au nord

E. Albina¹
S. Zientara²
C. Sailleau²
A. Perrin¹
C. Cêtre-Sossah¹
E. Bréard²
C. Grillet¹

¹ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad), Département Elevage et médecine vétérinaire tropicale (EMVT), Unité de recherche 1,5 Contrôle des Maladies, TA30/G, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5 <emmanuel.albina@cirad.fr>

² Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), Unité mixte de recherche en virologie 1161 Afssa-Envia-Inra, 23, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort

Résumé. La fièvre catarrhale ovine, ou *bluetongue*, est une maladie virale non contagieuse du mouton, transmise par piqûres de *Culicoides*, diptères hématophages. Elle est due à un orbivirus appartenant à la famille des *Reoviridae* dont le génome viral est constitué de 10 segments d'ARN bicaténaires, protégé par une capsid virale protéique à symétrie icosaédrique non enveloppée. Il existe à l'heure actuelle 24 sérotypes distincts de ce virus, chacun induisant une faible immunité protectrice contre les autres sérotypes. Si, classiquement, seul le mouton exprime la maladie après infection (hyperthermie, congestion des muqueuses et cyanose de la langue), les bovins, caprins et autres ruminants sauvages peuvent être infectés, mais ils expriment rarement la maladie. Autrefois cantonnée entre les 30-40° parallèles sud et les 40-50° parallèles nord, l'infection s'est récemment étendue vers le sud puis le nord de l'Europe. La raison de cette extension est double, la remontée du vecteur tropical *Culicoides imicola* vers le nord et l'adaptation du virus à de nouveaux vecteurs non encore identifiés mais pérennes en Europe septentrionale. La lutte contre la maladie repose sur l'utilisation de vaccins à virus atténué ou inactivé (un vaccin contre chaque sérotype) et la détection et l'élimination rapide des foyers introduits dans une zone indemne.

Mots clés : fièvre catarrhale ovine, bluetongue, orbivirus, reoviridae, *Culicoides*

Abstract. Bluetongue is a non contagious viral disease of sheep transmitted by bites of haematophagous midges. The disease is caused by an orbivirus belonging to the *Reoviridae* family. The genome is segmented in 10 double-strand RNA encapsidated in a non-enveloped spherical particle with a icosahedral symmetry. Twenty distinct serotypes have been identified so far, each of them inducing limited cross-protection against the others. Sheep are usually the only ones showing clinical signs like pyrexia, congestion of mucosa and cyanosis of the tongue. However, cattle, goat and wild ruminants can be asymptotically infected. Formerly restricted to the area between the 30/40th south and 40/50th north parallels, the infection has progressively extended to the south of Europe and was more recently introduced in the north. The reason for this extension might be twice : the northward spreading of the tropical vector *Culicoides imicola* and the adaptation of the virus to a yet unknown endemic biting midge. Control of the disease is based on the use of live-attenuated or inactivated vaccines specific of the serotype. In free area, emergency measures can also consist in the rapid detection and elimination of the outbreaks.

Key words: bluetongue, orbivirus, reoviridae, *Culicoides*

Tirés à part : E. Albina

revue

La fièvre catarrhale ovine (FCO, *bluetongue* ou BT) est une arbovirose non contagieuse qui, sous nos latitudes, provoque des signes cliniques chez les moutons, rarement chez les chèvres et les bovins. Elle se traduit dans la première espèce par une maladie généralisée associant hyperthermie, abattement, anorexie et développement de lésions œdémateuses congestives, hyperhémiques, voire hémorragiques, en particulier au niveau de la face et des muqueuses de l'oropharynx. Elle provoque la mort dans 2 à 20 % des cas. Autrefois limitée entre les latitudes 35° S et 40° N, elle s'est récemment répandue dans les pays d'Europe du sud, jusqu'alors indemnes, et a depuis tendance à persister dans la plupart de ces régions.

Les raisons de ces changements dans l'épidémiologie de la FCO sont complexes mais sont liées à de récentes extensions de la distribution de son vecteur majeur, un diptère hématophage du genre *Culicoides* de l'espèce *imicola*, et à la présence d'un réservoir permettant au virus de persister pendant l'hiver en l'absence de vecteurs adultes. Le lien entre le réchauffement climatique et l'augmentation de l'aire de distribution du vecteur *C. imicola* est fortement suspecté. Ainsi, la modélisation géographique des biotopes favorables à l'installation de ce vecteur identifie toute l'Europe du sud, en particulier une bonne partie du sud de la France, comme zone à risque [1]. Cependant, l'émergence en août 2006 de nombreux foyers de FCO aux Pays-Bas (459 foyers au 19 janvier 2007), en Allemagne (914 foyers), en Belgique (695 foyers), au Luxembourg (8 foyers) et dans le nord de la France (7 foyers) a bouleversé le schéma épidémiologique classique de la maladie.

L'origine du virus de sérotype 8 jusqu'alors non répertorié en Europe, reste indéterminée. L'infection se traduit par des signes cliniques marqués chez les bovins, rappelant certaines manifestations cliniques provoquées par la fièvre aphteuse. En outre, le vecteur *Culicoides imicola* n'a pas été détecté dans la zone infectée, signifiant qu'un autre vecteur a pris le relais avec tout autant d'efficacité.

L'incidence clinique de l'infection chez les ovins, voire chez les bovins, et la mise en place, en cas d'épizootie, de mesures de prophylaxie sanitaire et médicale entraînant de fortes pertes économiques pour une filière justifient l'inscription de cette maladie dans la liste des maladies à incidence majeure de l'Organisation mondiale de la santé animale (ex. Office international des épizooties, OIE).

Un arbovirus à multiples facettes

Classification et caractéristiques générales

Le virus responsable de la fièvre catarrhale ovine (BTV) est un virus non enveloppé à ARN double brin segmenté appartenant à la famille des *Reoviridae*, genre *Orbivirus*. C'est un virus quasi exclusivement transmis par des arthropodes vecteurs (Arbovirus pour *Arthropod borne virus*).

En 1959, Sabin [2] proposa de regrouper, au sein d'un groupe spécifique, des virus jusqu'alors classés dans le groupe des échovirus et isolés du tractus gastro-intestinal et de l'arbre respiratoire mais qui n'étaient pas directement associés à des entités cliniques définies. Il proposa le nom de réovirus pour virus respiratoires, entériques, orphelins. Cette famille s'est progressivement enrichie de virus apparentés et est aujourd'hui composée de douze genres : *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, *Aquareovirus*, *Cypovirus*, *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus*, *Seadomavirus* et *Idnoreovirus* [3].

Les virus de la famille des *Reoviridae* sont dépourvus d'enveloppe virale et possèdent une capsidie à symétrie icosaédrique dont la taille varie entre 60 à 80 nm (figure 1A). Cette dernière est constituée d'une capsidie externe et d'une capsidie interne (ou *core*). La masse molaire de la particule virale est d'environ 120.10⁶ Da [4]. Le génome est constitué de 10 à 12 segments d'ARN bicaténaire (la masse molaire du génome varie de 12 à 20 10⁶ Da). La densité des réovirus en gradient de chlorure de césium est de 1,33 à 1,39. Ces virus sont stables à -70 °C et +4 °C ; en revanche, ils perdent leur pouvoir infectieux à -20 °C.

Les réovirus sont caractérisés par un large spectre d'hôte et infectent vertébrés, oiseaux, mammifères, poissons ainsi qu'invertébrés et plantes. Les *Orbivirus* sont isolés de nombreuses espèces animales, y compris l'homme, et sont

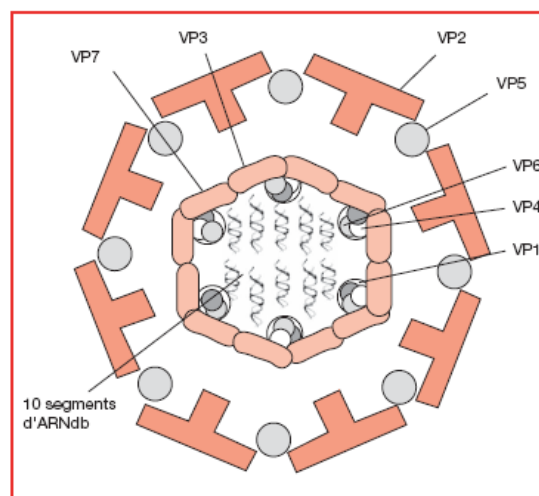


Figure 1. Représentation schématique de la structure des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et de la peste équine. Le cœur viral est constitué des protéines VP1, 3, 4 et 6 et des segments ARN. Autour de ce cœur, s'organise la couche externe de la capsidie interne constituée de la VP7. Autour de la capsidie interne, s'assemble la capsidie externe comprenant les protéines VP2 et VP5.

répandus dans le monde entier. Ils sont responsables de maladies majeures en médecine vétérinaire alors que, en médecine humaine, leur gravité est moindre. Ils sont transmis par l'intermédiaire de nombreux vecteurs biologiques : tiques, phlébotomes, moustiques, moucheron (*Culicoides...*). Parmi les *Orbivirus*, les virus de la *bluetongue* (BTV), de la maladie hémorragique épizootique du cerf (*epizootic hemorrhagic disease of deer virus*, EHDV) et de la peste équine (*African horsesickness virus*, AHSV) constituent des risques sanitaires majeurs. Les *Orbivirus* possèdent des caractères morphologiques, structuraux et biologiques communs. Ils sont divisés en sérogroupes, les virus d'un même séro groupe possédant un antigène commun localisé au niveau de la capsid interne qui leur confère une réactivité croisée en fixation du complément. Actuellement, 14 sérogroupes distincts sont identifiés ainsi qu'un ensemble de virus non groupés (*tableau 1*). Chaque séro groupe est divisé en sérotypes [5]. Des antigènes spécifiques de type sont associés à la capsid externe et induisent la production d'anticorps neutralisants.

Structure

Les virus BTV et AHSV possèdent sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) réparties en deux capsides (*figure 1B*). La capsid externe est composée de VP2 et VP5. La protéine VP2, constituant majeur de la capsid externe, exposée à la surface de la particule virale, est l'antigène spécifique de type [6]. Cet antigène a permis d'identifier 24 sérotypes différents du virus de la FCO. Les anticorps neutralisant le virus de la FCO sont induits par

des épitopes localisés sur la protéine VP2. Le site de fixation des orbivirus à leur récepteur cellulaire serait situé sur VP2 [7]. La capsid interne, ou *core*, est composée des deux protéines majeures VP3 et VP7 et de trois protéines mineures VP1, VP4 et VP6, ces dernières constituant les complexes de transcription. Les complexes de transcription sont disposés sur la face interne de la capsid formée par la protéine VP3, au niveau des pores situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique. Ils forment une structure en forme de fleur dans le cœur de la particule virale, autour desquels s'enroulent les segments d'ARN [8]. Ces derniers apparaissent en quatre couches concentriques dans le cœur de la particule virale lorsque l'observation est faite selon l'axe de symétrie passant par deux sommets de la particule [9]. La protéine VP3 est une protéine de la capsid interne qui possède des déterminants antigéniques spécifiques de groupe [10, 11]. La protéine VP7 est le composant majeur de la capsid interne du virus et possède également des déterminants antigéniques de groupe. Le génome, localisé dans la capsid interne est constitué de dix segments d'ARN double brin (db) de tailles différentes [12]. La taille totale du génome segmenté est d'environ 19 200 bases. Le *tableau 2* présente les caractéristiques des segments génomiques du virus de la FCO ainsi que de leurs produits d'expression. La composition moyenne de la totalité du génome séquencé est la suivante : 57 % (A + U) et 43 % (G + C). Les extrémités 5' et 3' de tous les segments génomiques sont conservées. À l'extrémité 5', on retrouve la séquence GUUAAA et, à l'extrémité 3', la séquence ACUUAC. La taille moyenne des séquences non codantes

Tableau 1. Les sérogroupes du genre *Orbivirus*

Sérogroupes	Nombre de sérotypes	Hôtes vertébrés	Invertébrés vecteurs
Bluetongue virus (BTV)	24	Ruminants domestiques et sauvages	Culicoïdes
Epizootic hemorrhagic disease of deer (EHDV)	8	Chameaux, bovins lamas, cerfs	Culicoïdes
Eubenangee	4	Inconnu	Culicoïdes, moustiques
African horsesickness (AHSV)	9	Equidés, zèbres, chiens, éléphants, chameaux, moutons, chèvres	Culicoïdes, moustiques
Encéphalose équine (EEV)	7	Chevaux	Culicoïdes,
Warrego	2	Marsupiaux	Culicoïdes,
Wallal	2	Marsupiaux	Culicoïdes,
Palyam	11	Bovins, moutons	Culicoïdes, moustiques
Changuinola	12	Humains, rongeurs	Culicoïdes, phlébotomes
Corripata	4	Humains, rongeurs	Moustiques
Kemerovo	40	Humains, rongeurs, oiseaux, bovins, moutons	Tiques
Umatilla	3	Oiseaux	Moustiques
Orungo	4	Humains, chameaux, bovins, chèvres, singes, moutons	Moustiques
Lebombo	1	Humains, rongeurs	Moustiques

revue

Tableau 2. Caractéristiques des segments génomiques et des protéines du virus de la BT sérotype 10 [12, 22]

Segments	Taille (en pb)	Région non codante en 5'	Région non codante en 3'	Protéines	Masse molaire (kDa)	Localisation	Nombre de molécules par virion	Fonctions ou propriétés
1	3954	11	37	VP1	149	Protéine mineure de la capside interne	10	- antigène de groupe - ARN polymérase
2	2926	19	39	VP2	111	Capside externe	180 (60 trimères)	- spécificité de type - antigène protecteur cellulaire - hémagglutinine - antigène de groupe
3	2770	17	50	VP3	103	Protéine majeure de la capside interne	120 (60 dimères)	- antigène de groupe
4	1981	7	41	VP4	76	Protéine mineure de la capside interne	20 (dimères ?)	- antigène de groupe - guanylyltransférase
5	1769	34	79	NS1	64	Protéine non structurale	0	antigène de groupe
6	1638	29	31	VP5	59	Capside externe	360 (120 trimères)	spécificité de type
7	1156	17	92	VP7	38	Protéine majeure de la capside interne	780 (260 trimères)	antigène de groupe
8	1124	19	34	NS2	41	Protéine non structurale	0	- associée aux corps d'inclusion - fixe les ARN messagers
9	1046	15	44	VP6/VP6A	36	Protéine mineure de la capside interne	72	- antigène de groupe - fixe les ARN sb et db (hélicase)
10	822	19/58	116	NS3/NS3A	25 572/ 24 020	Protéine non structurale	0	- glycoprotéine, - libération des virions

des extrémités 5' varie de 7 (segment 4) à 34 pb (segment 6) alors que les séquences non codantes des extrémités 3' sont plus longues, de 79 (segment 6) à 116 pb (segment 10, tableau 2).

Variabilité du génome

La comparaison des séquences nucléotidiques du segment 2 des BTV, AHSV et EHDV indique que le degré de similitude n'est que de 39 %. La séquence de ce gène est variable au sein même d'un sérotype puisque la comparaison des séquences des gènes 2 de la souche sauvage corse et du vaccin de même sérotype utilisé en Corse montre une identité de nucléotides de 96,5 % (identité acides aminés 98,4 %) sur l'ensemble de la séquence [13]. La comparaison des séquences en acides aminés des protéines VP2 de AHSV4 et BTV10 [11] permet d'émettre l'hypothèse que ces protéines auraient eu un ancêtre commun puis qu'elles auraient évolué, notamment sous l'influence de la pression de sélection du système immunitaire des hôtes respectifs de ces virus [12]. Seules leurs extrémités carboxyterminales sont conservées. Ces régions, non exposées à la surface du virion, pourraient être impliquées dans des interactions avec les protéines de capsid (notamment VP5 et VP7) [12]. Les segments 3 des BTV, AHSV et EHDV sont plus conser-

vés entre eux que ne le sont leurs segments 2 : 59 % des nucléotides des gènes 3 sont communs. Les gènes des segments 4, 6, 7, 8 et 9 sont également plus conservés avec respectivement 55,4, 49, 55,2, 53, 50,6 et 49,8 % d'identité entre le BTV et l'AHSV [14-17].

Cycle de réplication

La réplication du virus s'effectue dans le cytoplasme de la cellule. La transcription s'effectue à partir des brins négatifs d'ARN bicaténaires et nécessite une ARN polymérase ARN-dépendante d'origine virale. Les ARN messagers, coiffés et méthylés par des protéines virales non structurales, quittent la particule virale par des pores situés aux sommets de la capsid icosaédrique [4]. Des corps d'inclusion virale, ou viroplasm, dont le composant majeur est la protéine NS2, sont détectés dans le cytoplasme de la cellule infectée [18]. Ces structures semblent être le lieu de la morphogénèse des particules virales. Le cycle de réplication des orbivirus est rapide puisque, 8 à 10 heures après inoculation d'une culture de cellules MS ou Vero à haute multiplicité d'infection à 37 °C, le virus est décelé dans le surnageant de culture [19].

À cette phase d'éclipse succède une phase de croissance exponentielle jusqu'à la 24^e heure. L'attachement du virion

à la membrane cellulaire s'effectue par l'intermédiaire de la protéine VP2 et l'interaction de cette protéine avec son ligand cellulaire déclenche l'internalisation du virus [20]. Le virus se fixe à son récepteur localisé dans la membrane cellulaire dans un site caractérisé par la présence de molécules de clathrine. La membrane cellulaire s'invagine alors, produisant une vésicule (appelée *coated-pit*) dont la surface externe est recouverte de clathrine. Le récepteur cellulaire n'est pas identifié de façon définitive mais une sialoglycoprotéine membranaire seule ou en association avec un corécepteur interviendrait [20]. En outre, l'étude des interactions entre le BTV et les érythrocytes indique que le virus se fixerait par l'intermédiaire de la protéine VP2 à la sialoglycophorine A présente à la surface des hématies d'origine humaine et animale, offrant ainsi au virus la possibilité de circuler associé aux globules rouges et facilitant probablement sa transmission au vecteur hématophage [21]. La VP5 virale intervient lorsque le pH diminue dans les vésicules endosomales : cette protéine permet alors la perméabilisation des membranes compatibles avec ses propriétés de fusion membranaire *in vitro* [22]. Les vacuoles d'endocytose fusionnent avec des lysosomes. Huismans *et al.* [23] ont montré qu'une heure après pénétration du virus de la BT dans la cellule, la capside externe contenant les protéines VP2 et VP5 a été hydrolysée. Cette décapsidation est nécessaire à l'activation de la transcriptase virale [23]. Un mode de pénétration directe du virus de la BT dans la cellule cible a été décrit pour les particules infectieuses subvirales (qui résultent de la digestion du virion, *in vitro*, par la chymotrypsine et qui contiennent les produits de clivage de la protéine VP2) et les cores viraux (particules virales ne contenant pas les protéines externes VP2 et VP5) [24]. Les particules infectieuses subvirales et les cores sont 100 à 500 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes (*Aedes albopictus*) que pour les cellules de mammifères et sont 100 fois plus infectieuses pour les cellules d'insectes que les particules virales intactes [25]. La protéine d'attachement du virus aux cellules de *Culicoides* est la VP7 [26, 27].

L'induction de la transcription est effectuée dans les virions décapsidés. La protéine VP1 du virus de la fièvre catarrhale ovine, l'ARN polymérase ARN-dépendante du virus, a une température optimale d'activité de 28 °C alors que celle des autres réovirus est de 47 à 52 °C [28]. Cette propriété est à relier avec le fait que le BTV, comme l'AHSV, est transmis par des insectes hétérothermes dans lesquels il se réplique. Les brins négatifs des ARN db sont transcrits en ARN messagers précoces.

La transcription précoce est définie comme l'étape de transcription se déroulant dans le *core* viral et produisant des ARNm coiffés qui permettront la synthèse de protéines et serviront de matrice à la synthèse des ARN négatifs. Les ARNm précoces sont coiffés et polyadénylés. La protéine

VP4 serait, toujours chez le virus de la fièvre catarrhale, la guanilyl-transférase [29]. Les ARNm synthétisés à l'intérieur du *core* quitteraient celui-ci selon un mécanisme encore mal connu qui impliquerait un changement de conformation du *core* viral. Les ARN génomiques négatifs sont synthétisés à partir des ARN positifs préalablement transcrits. Cette synthèse s'effectue simultanément avec la formation des particules provirales. La protéine NS2, une phosphoprotéine, se fixe sur les ARN simples brins et interviendrait dans la réplication. Les brins complémentaires ainsi synthétisés restent associés sous forme d'ARN double brin. Les mécanismes par lesquels les dix ARN db génomiques s'associent ensemble à l'intérieur de chaque particule virale en formation restent inconnus. Les protéines VP6/VP6a du BTV, produits de traduction du segment 9 et qui possèdent des séquences en acides aminés communes à celles des hélicases, pourraient jouer un rôle dans l'encapsulation des ARN db [10]. Dans la particule virale, les segments d'ARN sont intimement associés aux complexes de transcription (VP1 + VP4 + VP6) situés aux 12 sommets de la particule à symétrie icosaédrique. Un seul segment d'ARN est localisé à chaque sommet, ce qui explique qu'un maximum de 12 segments d'ARN peut être intégré dans une particule virale de ce type (applicable à tous les réovirus). La réplication de l'ARN s'effectue au niveau de ces complexes, les ARN néosynthétisés étant libérés en dehors de la particule virale par les pores situés aux sommets de la particule icosaédrique. Deux heures après l'infection de la cellule, des protéines d'origine virale peuvent être détectées dans le cytoplasme. Cette production de protéines virales s'effectue aux dépens de la synthèse des protéines cellulaires. L'inactivation, inexpliquée, de la protéine VP4 responsable du phénomène de coiffe des ARNm explique l'arrêt de la traduction des ARNm coiffés (traduction « coiffe-dépendante ») aux profits de la traduction des ARNm tardifs non coiffés (traduction « coiffe-indépendante »). Ces derniers codent pour des protéines structurales.

L'étude des produits d'expression en système eucaryote des protéines structurales VP2, VP3 et VP5 du virus de la fièvre catarrhale ovine [10, 30] permet de proposer le schéma d'assemblage suivant. Les protéines VP3 synthétisées forment dans le cytoplasme une particule instable à géométrie icosaédrique. Les trois protéines VP1, VP4 et VP6 interagissent avec cette structure dans laquelle les ARN double brin sont encapsidés. La protéine VP7, sous forme de trimère, se fixe à la surface de cette capsid interne et en rigidifie la structure, puis les protéines VP2 et VP5 constituent, dans une dernière étape, la capsid externe. Les particules virales sont associées aux filaments du cytosquelette *via* les protéines VP2 et/ou VP5 et transportées vers le système membranaire de la cellule (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi). Les protéines NS3 et NS3A sont

revue

ancrées dans les membranes des vésicules intracellulaires et dans la membrane plasmique. Ces deux protéines permettraient la fixation et le transport des particules virales dans les compartiments membranaires de la cellule et favoriseraient la libération des virions par bourgeonnement [31]. Des échanges de segments génomiques peuvent se produire lors d'infections simultanées d'une cellule par deux *Orbivirus* d'un même groupe mais de sérotype différent [32]. La fréquence de réassortiment des gènes est variable : certains gènes, soumis à une forte pression de sélection, sont plus fréquemment échangés que d'autres [5]. Ce phénomène de réassortiment participe à l'évolution génétique des *Orbivirus*. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur l'importance et la fréquence de ces réassortiments dans la nature.

Interactions hôtes-virus et pathologies associées

Infection chez les ruminants

Après infection par piqûre d'insecte, le virus se réplique d'abord dans le nœud lymphatique adjacent puis diffuse par la voie lymphatique et hématique à l'ensemble des organes et tissus. Il infecte les cellules endothéliales vasculaires, les macrophages et les cellules dendritiques. L'infection des cellules endothéliales a pour conséquence des thromboses vasculaires et des nécroses ischémiques des tissus irrigués, à l'origine de lésions d'ulcération buccale, de nécrose musculaire et d'extravasation sanguine (pétéchies). L'infection naturelle produit une virémie prolongée, jusqu'à 11 jours chez le mouton et jusqu'à 49 jours chez le bovin et la transmission du virus au vecteur a été montrée jusqu'à 21 jours post-infection chez le mouton et le bovin [33]. Toutefois, l'ARN viral peut être détecté jusqu'à 111-222 jours post-infection. Le virus circule associé aux cellules blanches et rouges du sang dans les premières phases de l'infection, puis il est presque exclusivement associé aux globules rouges dans les phases tardives. Cette association favorise probablement la persistance du virus et sa transmission aux diptères hématophages. Un récent travail incrimine les lymphocytes $T\gamma\lambda$, particulièrement abondants chez les ruminants, dans la persistance du virus au niveau de la peau, jusqu'à 9 semaines chez le mouton après infection intradermique, soit 5 à 6 semaines après que le virus n'est plus détecté dans le sang périphérique [34]. La réponse inflammatoire intense résultant des piqûres de culicoïdes recruterait et activerait ces lymphocytes $T\gamma\lambda$ au niveau de la peau, permettant alors un cycle de réplication viral important et favorisant la transmission du virus aux vecteurs lors des prochains repas de sang. Ce mécanisme pourrait contribuer à la persistance du virus chez l'animal au cours de l'hiver dans les régions les plus septentrionales,

lorsque les culicoïdes ne sont plus actifs sur plusieurs semaines consécutives.

C'est dans l'espèce ovine que la maladie peut revêtir toute sa gravité. Cependant, pour diverses raisons (telles que des variations du pouvoir pathogène selon les sérotypes ou les souches, les vecteurs impliqués ou la résistance particulière de certaines races ovines), l'infection n'entraîne pas toujours l'apparition de symptômes. Ainsi, tous les intermédiaires entre la forme aiguë et les formes inapparentes sont observés. Les formes cliniques graves ne sont décrites que chez des ovins vivant dans des régions contaminées pour la première fois (cas de la Corse en 2000) ou sur des races améliorées (comme les races corses ou sardes) [35]. Après une période d'incubation moyenne de 2 à 6 jours (avec un maximum de 18 jours), les animaux présentent une hyperthermie (pouvant atteindre 42 °C) associée à une anorexie et un abattement pendant 4 à 8 jours. Des phénomènes congestifs, œdémateux et hémorragiques apparaissent alors. Au niveau des muqueuses buccales, de vastes zones de congestion (figure 2) et d'hémorragies punctiformes accompagnées d'hypersalivation apparaissent, évoluant vers l'ulcération, la langue devient cyanotique (d'où le nom de *bluetongue*), signe cependant inconstant. L'anorexie est alors totale. Des œdèmes sont observables dans l'espace interdigité et sur le bourrelet coronaire des ongles (figure 2). Des pétéchies sont visibles à travers le revêtement cutané et, par endroits, le tégument se rompt, donnant naissance à de petits ulcères allongés, engendrant une boiterie importante sur les animaux les plus touchés. La congestion de la peau peut se généraliser, entraînant une chute de la laine en quelques semaines. Parallèlement à ces signes cliniques, il est décrit une atteinte musculaire avec myosite dégénérative ainsi que des complications d'ordre pulmonaire ou digestif. Des avortements sont aussi signalés [36].

Chez les bovins et caprins, l'infection est généralement inapparente et se limite à une simple hyperthermie transitoire. Toutefois, dans quelques cas, une forme aiguë peut se manifester. Les symptômes suivants peuvent être retrouvés : hyperthermie accompagnée de dyspnée et d'hypersalivation. De plus, en raison de son passage par voie transplacentaire, le virus provoque des avortements et des mortinatalités. En Corse, chez les bovins et les caprins, aucune manifestation clinique n'a été rapportée. En revanche, l'épisode récent apparu en Europe du nord montre une sensibilité accrue des bovins au sérotype 8 circulant dans cette zone.

Des études sérologiques ont montré que, dans la faune sauvage africaine, de nombreuses espèces (notamment les buffles, les chameaux, les grands koudous, les impalas et les springboks) possédaient des anticorps contre le virus sans aucun signe clinique apparent. En Amérique du Nord, des cerfs muets et wapitis ont été trouvés séropositifs. Le rôle

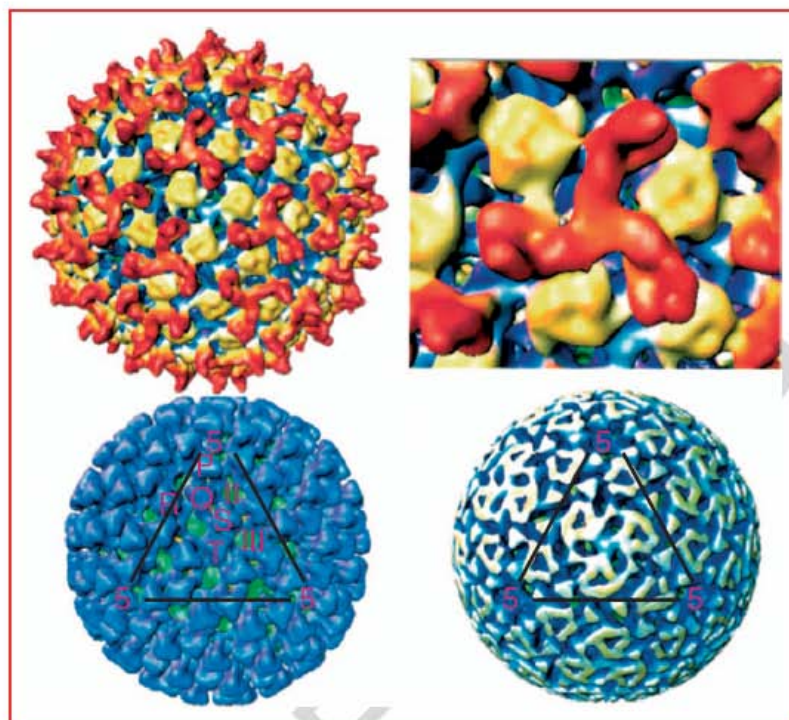


Figure 2. Représentation cristallographique de la capside virale externe et interne du virus FCO, sérotype 10 [8]. L'image en haut à gauche représente la capside externe avec les trimères de VP2 en rouge, et les trimères de VP5 en jaune. En haut, à droite, vue agrandie. En bas, à gauche, capsid interne de structure icosaédrique comprenant 12 pentons et 120 hexons. Deux cent soixante trimères de VP7, soit 780 molécules de VP7, entrent dans la constitution de ces 132 capsomères. Chacune des 60 unités de structure de la particule icosaédrique, représentée sur la figure par une surface triangulaire passant par trois axes de symétrie d'ordre 5, est constituée de 13 facettes (nombre de triangulation T égal à 13) correspondant à 13 molécules de VP7, arrangées en 5 trimères de VP7 repérés par les lettres P, Q, R, S et T. La coque VP7 interagit avec une structure icosaédrique interne formée par des monomères de VP3 (image de droite). Chaque unité de structure de la particule icosaédrique recouvre deux monomères de VP3 (T égal à 2). 120 molécules suffisent à la formation du polyèdre interne à 20 faces, grâce à une distorsion moléculaire des monomères VP3.

de ces espèces animales dans l'épidémiologie de la maladie n'est pas encore connu.

Infection du vecteur

Les *Culicoides* sont des diptères hématophages d'environ 2 mm de taille appartenant à la famille des *Ceratopogonidae* (figure 3). Seulement 17 espèces de *Culicoides* parmi les 1 254 répertoriées ont été incriminées dans la transmission du virus *bluetongue* [37]. Les espèces principales avérées ou fortement suspectées sont *C. imicola* (Afrique, Europe, Asie), *C. bolitinos* (Afrique), *C. brevitarsis* (Australie), *C. variipennis* (Amérique du Nord) et *C. insignis* et *C. pusillus* (Amérique centrale et du sud) [25, 37]. Cependant des foyers de FCO ont été déclarés dans des régions d'Europe où *C. imicola* n'a encore jamais été identifié. Ce fut le cas pour les épisodes bulgares de 1999 et 2001, impliquant le sérotype 9, pour lesquels le rôle des groupes

d'espèces *C. obsoletus* et *C. pulicaris* dans la transmission est fortement suspecté [38]. C'est le cas pour l'épisode actuel en Europe septentrionale. Le rôle d'espèces comme celles appartenant aux groupes *C. obsoletus* (*C. obsoletus* ss, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, *C. montanus* et *C. chiopterus*) et *C. pulicaris* très largement répandus au nord est à suspecter [39]. En outre, *C. obsoletus* et *C. pulicaris* peuvent être infectés de façon expérimentale par repas de sang contenant du virus *bluetongue* à des taux assez importants [40].

La température joue un rôle dans la capacité vectorielle (capacité du vecteur à transmettre l'infection) de ces espèces de *Culicoides*. Ainsi, il a été montré que, pour *C. imicola*, le délai nécessaire à la multiplication du virus à un titre minimal nécessaire pour une transmission à l'animal est de 4 jours à 30 °C et de 10 jours à 23,5 °C [41]. La réplication virale à 15 °C n'est pas suffisante pour une

revue



Figure 3. Signes cliniques chez les ovins en haut (photos : C. Hamblin, Institute for animal Health, Pirbright, GB). A gauche : congestion des muqueuses. A droite : inflammations des bourrelets coronaires. En bas, signes cliniques observés sur les bovins lors du dernier épisode en Europe du nord (photos : Etienne Thiry, ULG, Belgique et Piet van Rijn, Pays-Bas).

éventuelle transmission et, à 10 °C, aucune réplication virale n'est détectée.

De même, des différences de compétence vectorielle (capacité du vecteur à s'infecter et à répliquer le virus) entre sérotypes ont été observées pour les vecteurs *C. imicola* ss ou *C. bolitinos* [42]. Le sérotype 8, en cause dans les récents foyers d'Europe du nord, n'est pas transmis pas *C. imicola*, non détecté dans les piégeages, mais probablement par des espèces européennes locales telles que *C. obsoletus* ou *C. scoticus* suspectées d'intervenir dans la transmission de la BT dans d'autres zones sud-européennes où *C. imicola* n'est pas présent (Balkans, Italie péninsulaire). *C. dewulfi* a été également incriminé dans la mesure où de l'ARN du BTV8 a été détecté chez des individus capturés à Limburg aux Pays-Bas dans la zone index de l'épizootie [Baldet, communication personnelle]. Finalement, la vision de la dynamique des vecteurs responsables de la trans-

mission du virus *bluetongue* est très restreinte. C'est en partie la conséquence d'un manque de ressources humaines en entomologie médicale et du trop récent développement des outils moléculaires sur les *Culicoides*. Toutefois, des tests PCR pour l'identification rapide des *Culicoides* adultes ou larvaires [43] associés à des tests PCR spécifique du virus *bluetongue*, ainsi que les études en phylogénétique [44, 45] permettent d'envisager une meilleure connaissance des vecteurs potentiels, de leurs biotopes et des méthodes possibles de contrôle.

Épidémiologie et diagnostic

Décrite pour la première fois en 1881 en Afrique du Sud, la fièvre catarrhale ovine s'est étendue, à partir de 1940, en Afrique centrale pour atteindre ensuite le bassin méditerranéen.

néen (Israël, Turquie, Syrie, Oman, Arabie Saoudite) et l'Asie (Inde, Chine, Pakistan, Japon, Indonésie, Inde, Malaisie). À l'heure actuelle, elle est également signalée en Amérique du Nord (États-Unis, Canada), Amérique Centrale, Amérique du Sud (Mexique, Chili, Brésil, Guyane), Australie et Nouvelle Zélande. Traditionnellement, elle est signalée sur tous les continents dans une zone comprise au nord entre le 40° et le 50° parallèle et au sud entre le 20° et le 30° parallèle, mais tous les sérotypes n'y sont pas représentés de façon identique. En Europe, la fièvre catarrhale ovine a déjà fait incursion à trois reprises (au Portugal et en Espagne de 1957 à 1960, à Chypre en 1977, en Grèce en 1980 sur l'île de Lesbos) mais l'efficacité des mesures défensives (abattage des animaux infectés et contaminés, désinsectisation...) ainsi que les conditions climatiques peu favorables à la survie du vecteur ont contribué à son éradication. Les territoires et départements d'outre-mer français sont infectés de façon endémique. Le dernier virus isolé sur l'île de la Réunion en 2002 était de sérotype 3 [46].

Plus récemment, en 1998, cette maladie a fait son apparition dans les îles grecques du sud-est de la mer Egée. En 1999, des cas ont été enregistrés en Grèce, Bulgarie, Tunisie et Turquie ; en 2000 en Tunisie, Algérie, Italie (Sardaigne, Sicile et Calabres), Espagne (îles Baléares), à nouveau en Grèce et finalement en France sur l'île de la Corse (49 foyers) [36, 47]. L'origine du virus dans le bassin méditerranéen est double, une introduction depuis l'Asie (Turquie ?) pour certains sérotypes retrouvés en Italie et une introduction depuis le Maghreb pour d'autres sérotypes retrouvés en Espagne, France et Italie [48]. La maladie s'est installée durablement au moins en Italie et en Corse. Elle a été dans un premier temps contrôlée en 2001, en Espagne (îles Baléares), puis réintroduite depuis le Maroc en 2004. En 2004, le Portugal a également été concerné en lien avec les foyers espagnols. Elle s'est également étendue au nord et a sévi en Bulgarie, au Kosovo et en Serbie [48]. En août 2006, plusieurs dizaines de foyers ont été diagnostiqués pour la première fois dans le nord de l'Europe, Allemagne, Belgique, Pays-Bas, Luxembourg et enfin France (Meuse et Ardennes). L'origine de l'infection reste indéterminée. Le vecteur principal du virus en Europe du sud (*C. imicola*) n'a pas été retrouvé en Europe du nord, suggérant qu'un nouveau vecteur a pris le relais. En effet, la transmission ne se fait presque exclusivement que par les vecteurs *Culicoides* : un animal infecté ne peut contaminer un autre animal par contact direct. Des cas de transmission par voie vénérienne ou par transfert d'embryons ont été décrits mais ils restent anecdotiques sur le plan épidémiologique.

Les sérotypes impliqués au cours des différents épisodes récents observés en Europe sont indiqués en figure 4.

Chez les ovins, la fièvre catarrhale ovine peut être diagnostiquée cliniquement lors de l'observation de syndromes



Figure 4. *Culicoides imicola* (photo Bruno Matthieu, EID).

fébriles associés à des lésions des muqueuses oronasales. Dans les autres espèces (bovine ou caprine), le diagnostic est difficile du seul point de vue clinique. Sur un plan épidémiologique, cette maladie ne survient sous nos latitudes que durant les périodes chaudes de l'année qui permettent au vecteur de se multiplier. À l'autopsie, les lésions sont caractérisées par la présence d'œdèmes dans la plupart des tissus. Les muqueuses du tractus digestif et génito-urinaire sont le siège de pétéchies ou d'ecchymoses localisées, parfois cyanotiques. Il est quelquefois observé de l'œdème et des hémorragies dans les poumons et sur la paroi artérielle à la base de l'artère pulmonaire. Le tissu conjonctif sous-cutané est infiltré de liquide gélatineux. Les muscles sont le siège d'une importante dégénérescence. Le diagnostic différentiel en France doit tenir compte de la présence enzootique de l'ecthyma contagieux provoquant des lésions péri-buccales de nature papulocroûteuse ou ulcéral. Cependant, des vésiculopustules ou des nodules sont observées sur l'ensemble du corps et cette infection ne provoque pas d'œdème. La fièvre aphteuse, en raison des lésions buccales et podales qu'elle provoque, devrait être suspectée de façon systématique. Ses lésions sont cependant beaucoup moins prononcées que lors d'un épisode de fièvre catarrhale ovine et surtout ne sont pas accompagnées d'œdèmes. La fièvre catarrhale ovine peut également être confondue avec la nécrobacillose qui provoque des ulcères profonds chez des animaux dénutris ou immunodéprimés et les allergies aux piqûres d'insectes qui se caractérisent par des papules œdémateuses puis par des vésicules et ulcères superficiels.

Le diagnostic de laboratoire est la plupart du temps indispensable pour confirmer le diagnostic clinique, mais surtout pour identifier le sérotype incriminé. Le diagnostic virologique consiste à mettre en évidence le virus (diagnos-

revue

tic conventionnel) ou son génome (diagnostic moléculaire). En cas de suspicion, il convient de prélever 5 ml de sang sur anticoagulant (EDTA) pendant la phase d'hyperthermie qui correspond à la phase de virémie. Sur le cadavre frais, seront prélevés la rate, le cœur et/ou les nœuds lymphatiques. Après acheminement des prélèvements au laboratoire, sous régime du froid, le virus pourra être isolé après passage sur œufs embryonnés de 9 à 11 jours [49], puis sur culture cellulaire (cellules BHK ou Vero). Le typage peut être effectué, après isolement du virus, par neutralisation virale sur cultures de cellules à l'aide des 24 sérums hyperimmuns spécifiques produits sur ovins ou lapins. Des techniques plus rapides font appel à l'amplification génique ou RT-PCR : l'amplification de gènes hautement conservés (les segments 7, 8, 9 et 10) chez les 24 sérotypes permet le diagnostic du virus *bluetongue* en 24 heures [13]. Ces techniques présentent une haute spécificité ainsi qu'une grande sensibilité. Une amélioration technologique (la PCR en temps réel) basée sur l'utilisation de fluorophores permet maintenant la quantification du génome dans les prélèvements [50]. Le typage peut aussi être effectué par RT-PCR spécifique de type [47].

De nombreuses techniques de détection des anticorps sériques ont été mises au point mais seules deux d'entre elles sont recommandées par l'OIE [51] : l'immunodiffusion en gélose et l'Elisa de compétition qui est aujourd'hui le test plus utilisé (plusieurs kits sont commercialisés). Ces deux techniques permettent un diagnostic de groupe puisqu'elles reposent sur la reconnaissance d'antigènes communs aux 24 sérotypes. Les prélèvements à effectuer sont des prises de sang sur tube sec (10 ml environ). Dans les régions où les cheptels ovins sont vaccinés, la séropositivité peut être attribuée à la détection d'anticorps post-vaccinaux. La neutralisation virale sur culture de cellules est utilisée pour identifier le sérotype en cause ou pour déterminer le ou les sérotypes contre lesquels un animal a été immunisé. Cependant, en raison des nombreuses réactions croisées entre sérotypes, l'interprétation peut être délicate.

Contrôle

Conformément aux prescriptions de l'OIE et aux recommandations de l'Union européenne qui visent à prévenir toute extension de la maladie, des restrictions aux mouvements des ruminants sont appliquées aux régions infectées. Ces mesures consistent pour l'essentiel en l'isolement des animaux malades, la mise sous surveillance de l'exploitation par arrêté préfectoral, l'interdiction de tout mouvement des espèces sensibles, la réalisation de prélèvements destinés à localiser la présence de la fièvre catarrhale ovine, le traitement des animaux et des bâtiments contre les insectes et, enfin, la surveillance entomologique par la mise en

œuvre de piégeages. En raison de la présence du virus en Corse, en Espagne et en Italie, des enquêtes sérologiques et entomologiques ont été organisées dans les départements du littoral méditerranéen. Cependant, compte tenu du caractère vectoriel de la FCO, l'efficacité des mesures de contrôle sanitaires est limitée. La vaccination est actuellement le meilleur moyen de lutte contre cette maladie vectorielle. Dès la connaissance de la présence du virus de la fièvre catarrhale ovine en Corse, les services vétérinaires français ont pris la décision de la mise en œuvre d'une prophylaxie médicale. Ainsi, une campagne de vaccination à l'aide d'un vaccin à virus atténué monovalent (sérotyp 2, [52, 53]) a été organisée après l'isolement et le typage du virus responsable des premières épizooties corses en 2000. Après deux campagnes de vaccination en 2000 et 2001 contre ce sérotyp, celui-ci n'a plus été isolé lors des épizooties de 2003 et 2004. En 2004, des campagnes similaires ont été menées contre les sérotypes 4 et 16, toujours avec des vaccins à virus atténué. En décembre 2004, l'utilisation du vaccin à virus atténué sérotyp 16 a été suspendue, suite à l'apparition, dans les élevages ovins vaccinés, de signes cliniques évocateurs de la maladie. La mauvaise atténuation du vaccin semblait en être la cause. L'utilisation d'un vaccin vivant peut présenter un certain nombre de risques : atténuation insuffisante ou retour à la virulence de la souche vaccinale, effets tératogènes (les animaux en gestation ne pouvant être vaccinés), risque de réassortiment génétique avec un virus sauvage et, enfin, les souches vaccinales circulent dans le sang périphérique et sont susceptibles d'être transmises à d'autres animaux par le biais des *Culicoides*. Depuis 2004, les autorités vétérinaires françaises ont préconisé l'utilisation de nouveaux vaccins à virus inactivé. Ces vaccins contre les sérotypes 2 et 4, réalisés à partir d'isolats corses, sont maintenant utilisés en Corse, en Italie et en Espagne. D'autres vaccins, utilisant des antigènes composés de pseudo-particules constituées des protéines de structure VP2-VP5 ou basés sur des vaccins recombinants de type vaccine, canarypox ou capripox, ont donné des résultats prometteurs mais ne sont pas encore commercialisés [12, 54-56].

Compte tenu de la pluralité antigénique du virus *bluetongue* (24 sérotypes différenciés par séroneutralisation), la vaccination contre un sérotyp à l'aide d'un vaccin à virus atténué ou inactivé monovalent n'engendre pas de protection croisée avec les 23 autres sérotypes. La vaccination contre plusieurs sérotypes nécessite l'utilisation en mélange de plusieurs sérotypes atténués ou inactivés. Des vaccins de nouvelle génération permettant de vacciner contre plusieurs sérotypes sont en cours de développement. Ils sont basés sur l'expression d'antigènes conservés comme la VP7 [56] (figure 5 **Merci de replacer cet appel de figure, initialement absent du texte, au bon endroit.**).

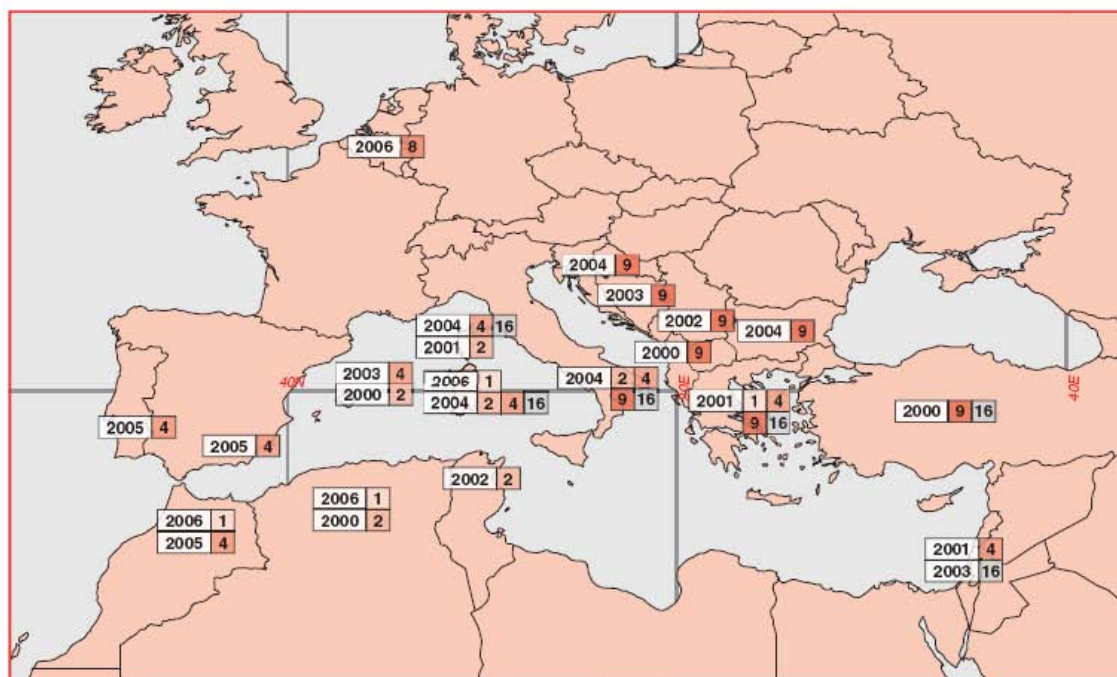


Figure 5. Distribution des sérotypes du virus de la bluetongue identifiés en Europe depuis la fin des années 90 (source FAO).

Conclusion

La fièvre catarrhale ovine, traditionnellement maladie exotique en Europe, est en quelques années devenue enzootique dans les pays d'Europe du sud (Portugal, Espagne, Italie et France) et s'est même tout récemment invitée en Europe du Nord (Allemagne, Pays-Bas, Belgique et Luxembourg). Si dans le premier cas, le réchauffement climatique peut être incriminé comme à l'origine de l'infection, en permettant aux vecteurs de remonter vers le nord, dans le second cas, l'émergence des foyers est probablement liée à l'introduction d'un animal virémique suivie d'une transmission locale par de nouveaux vecteurs endémiques encore non identifiés. Dans les deux cas, le lecteur trouvera une origine humaine à l'extension de cette infection « tropicale », conséquence de la globalisation des activités et de leurs effets secondaires et des échanges commerciaux.

Références

1. Tatem AJ, Baylis M, Mellor PS, *et al.* Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and north Africa using satellite imagery. *Vet Microbiol* 2003 ; 97 : 13-29.
2. Sabin AB. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science* 1959 ; 20 : 1387-9.

3. Mertens PPC, Attoui H, Duncan R, Dermody TS. Reoviridae. In : Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London : Elsevier/Academic Press, 2005.
4. Urbano P, Urbano FG. The Reoviridae family. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994 ; 17 : 151-61.
5. Gould AR, Hyatt AD. The orbivirus genus. Diversity, structure, replication and phylogenetic relationships. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1994 ; 17 : 163-88.
6. Vreede FT, Huismans H. Cloning, characterization and expression of the gene that encodes the major neutralization-specific antigen of African horsesickness virus serotype 3. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 3629-33.
7. Burrage TG, Trevejo R, Stone-Marschat M, Laegreid WW. Neutralizing epitopes of African horsesickness virus serotype 4 are located on VP2. *Virology* 1993 ; 196 : 799-803.
8. Nason EL, Rothagel R, Mukherjee SK, *et al.* Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *J Virol* 2004 ; 78 : 8059-67.
9. Gouet P, Diprose JM, Grimes JM, *et al.* The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography. *Cell* 1999 ; 97 : 481-90.
10. Roy P. Bluetongue virus proteins. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 3051-64.
11. Iwata H, Yamagawa M, Roy P. Evolutionary relationships among the gnat-transmitted orbiviruses that cause African horse sickness, bluetongue, and epizootic hemorrhagic disease as evidenced by their capsid protein sequences. *Virology* 1992 ; 191 : 251-61.
12. Roy P, Bishop DH, LeBlois H, Erasmus BJ. Long-lasting protection of sheep against bluetongue challenge after vaccination with virus-like particles : evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine* 1994 ; 12 : 805-11.

revue

13. Bréard E, Sailleau C, Coupier H, *et al.* Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet Res* 2003 ; 34 : 1-13.
14. Yu YD, Fukusho A, Roy P. Nucleotide sequence of the VP4 core protein gene (M4 RNA) of US bluetongue virus serotype 10. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 7206.
15. Lee J, Roy P. Complete sequence of the NS1 gene (M6 RNA) of US bluetongue virus serotype 10. *Nucleic Acids Res* 1987 ; 15 : 7207.
16. van Staden V, Theron J, Greyling BJ, Huismans H, Nel LH. A comparison of the nucleotide sequences of cognate NS2 genes of three different orbiviruses. *Virology* 1991 ; 185 : 500-4.
17. Mizukoshi N, Sakamoto K, Iwata A, *et al.* The complete sequence of African horsesickness virus serotype 4 (vaccine strain) RNA segment 5 and its predicted polypeptide compared with NS1 of bluetongue virus. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 2425-8.
18. Modrof J, Lymeropoulos K, Roy P. Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies. *J Virol* 2005 ; 79 : 10023-31.
19. Brees Jr. SS, Ozawa Y. Intracellular inclusions resulting from infection with African horsesickness virus. *J Virol* 1969 ; 4 : 109-12.
20. Hassan SS, Roy P. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein : role in cell entry. *J Virol* 1999 ; 73 : 9832-42.
21. Eaton BT, Crameri GS. The site of bluetongue virus attachment to glycoporins from a number of animal erythrocytes. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3347-53.
22. Forzan M, Wirblich C, Roy P. A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 2100-5.
23. Huismans H, van Dijk AA, Bauskin AR. In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. *J Virol* 1987 ; 61 : 3589-95.
24. Mertens PP, Burroughs JN, Anderson J. Purification and properties of virus particles, infectious subviral particles, and cores of bluetongue virus serotypes 1 and 4. *Virology* 1987 ; 157 : 375-86.
25. Mellor PS. The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990 ; 162 : 143-61.
26. Xu G, Wilson W, Mecham J, Murphy K, Zhou EM, Tabachnick W. VP7 : an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in Culicoides variipennis. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 1617-23.
27. Tan BH, Nason E, Staeuber N, Jiang W, Monastyrskaya K, Roy P. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to Culicoides cells. *J Virol* 2001 ; 75 : 3937-47.
28. Kapuler AM. An extraordinary temperature dependence of the reovirus transcriptase. *Biochemistry* 1970 ; 9 : 4453-7.
29. Le Blois H, French T, Mertens PP, Burroughs JN, Roy P. The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. *Virology* 1992 ; 189 : 757-61.
30. Liu HM, Booth TF, Roy P. Interactions between bluetongue virus core and capsid proteins translated in vitro. *J Gen Virol* 1992 ; 73 : 2577-84.
31. Beaton AR, Rodriguez J, Reddy YK, Roy P. The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 13154-9.
32. Gorman BM, Taylor J, Walker PJ, Young PR. The isolation of recombinants between related orbiviruses. *J Gen Virol* 1978 ; 41 : 333-42.
33. Bonneau KR, DeMaula CD, Mullens BA, MacLachlan NJ. Duration of viraemia infectious to Culicoides sonorensis in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet Microbiol* 2002 ; 88 : 115-25.
34. Takamatsu H, Mellor PS, Mertens PP, Kirkham PA, Burroughs JN, Parkhouse RM. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *J Gen Virol* 2003 ; 84 : 227-35.
35. Zientara S, Gourreau JM. La fièvre catarrhale du mouton. *Virologie* 2001 ; 5 : 449-51.
36. Zientara S, de la Rocque S, Gourreau JM, *et al.* La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidemiol Santé anim* 2000 ; 38 : 133-44.
37. Meiswinkel R. Afrotropical Culicoides : a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera : Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1989 ; 56 : 23-39.
38. Purse BV, Nedelchev N, Georgiev G, *et al.* Spatial and temporal distribution of bluetongue and its Culicoides vectors in Bulgaria. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 335-44.
39. Caracappa S, Torina A, Guercio A, *et al.* Identification of a novel bluetongue virus vector species of Culicoides in Sicily. *Vet Rec* 2003 ; 153 : 71-4.
40. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS. Oral susceptibility to bluetongue virus of Culicoides (Diptera : Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol* 2006 ; 43 : 73-8.
41. Paweska JT, Venter GJ, Mellor PS. Vector competence of South African Culicoides species for bluetongue virus serotype 1 (BTV-1) with special reference to the effect of temperature on the rate of virus replication in *C. imicola* and *C. bolitinos*. *Med Vet Entomol* 2002 ; 16 : 10-21.
42. Venter GJ, Mellor PS, Paweska JT. Oral susceptibility of South African stock-associated Culicoides species to bluetongue virus. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 329-34.
43. Cetre-Sossah C, Baldet T, Delecalle JC, *et al.* Molecular detection of Culicoides spp. and Culicoides imicola, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Vet Res* 2004 ; 35 : 325-37.
44. Perrin A, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Baldet T, Delecalle JC, Albina E. Phylogenetic analysis of Culicoides species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 219-28.
45. Gomulski LM, Meiswinkel R, Delecalle JC, Goffredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus Culicoides and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Entomol* 2006 ; 20 : 229-38.
46. Breard E, Sailleau C, Hamblin C, Zientara S. Bluetongue virus in the French island of Réunion. *Vet Microbiol* 2005 ; 106 : 157-65.
47. Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, *et al.* Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* 2002 ; 19 : 598-601.
48. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PPC, Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 2005 ; 3 : 171-81.
49. Clavijo A, Heckert RA, Dulac GC, Afshar A. Isolation and identification of Bluetongue virus. *J Virol Methods* 2000 ; 87 : 13-23.
50. Orru G, Ferrando ML, Meloni M, Liciardi M, Savini G, De Santis P. Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *J Virol Methods* 2006 ; 137 : 34-42.
51. OIE. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 5th Edition.* Paris : Office international des épizooties, 2004.
52. Hunter P, Modumo J. A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res* 2001 ; 68 : 331-3.
53. Hammoumi S, Bréard E, Sailleau C, *et al.* Studies on the safety and immunogenicity of the South African bluetongue virus serotype 2 monovalent vaccine : specific detection of the vaccine strain genome by RT-PCR. *J Vet Med B Inf Dis Vet Pub Health* 2003 ; 50 : 316-21.
54. Lobato ZI, Coupar BE, Gray CP, Lunt R, Andrew ME. Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet Immunol Immunopathol* 1997 ; 59 : 293-309.
55. Boone JD, Balasuriya UB, Karaca K, *et al.* Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine*, 2006 ; volume? pages? .
56. Wade-Evans AM, Romero CH, Mellor P, *et al.* Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology* 1996 ; 220 : 227-31.

Molecular Identification of Western European Species of *Obsoletus* Complex (Diptera: Ceratopogonidae) by an Internal Transcribed Spacer-1 rDNA Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay

BRUNO MATHIEU,¹ AURÉLIE PERRIN,² THIERRY BALDET,² JEAN-CLAUDE DELÉCOLLE,³
EMMANUEL ALBINA,² AND CATHERINE CÊTRE-SOSSAH^{2,4}

J. Med. Entomol. 44(3): 000–000 (2007)

ABSTRACT In southern Europe, orbiviral diseases such as bluetongue (BT) have been assumed to have been largely transmitted by the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae). Recent outbreaks have occurred in regions where *C. imicola* is normally absent, supporting the theory that other species belonging to the *Obsoletus* or *Pulicaris* complexes may play a role in BT virus transmission. Investigations of the ecology of the species within the former group are hampered by females of member species being extremely difficult to separate by classical morphology. To allow straightforward separation of these species in France, a multiplex polymerase chain reaction-based on internal transcribed spacer (ITS)-1 rDNA was developed to distinguish between *Culicoides chiopterus* Meigen, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *Culicoides montanus* Shakirjanova, *Culicoides obsoletus* Meigen, and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle. This tool will be useful in defining both the vector role and larval biotopes of these species in Europe.

KEY WORDS BTV, molecular phylogeny, *Culicoides*, *Obsoletus* complex

The genus *Culicoides* Latreille is currently represented by some 1,254 species (Beckenbach and Borkent 2003) and includes several complexes of sibling species that are difficult to separate by classical morphology. Correct identification of these species, however, is essential for the understanding of disease epidemiology, particularly when only few of the species in the complex have been implicated in disease transmission.

Bluetongue (BT) and African horse sickness are infectious arthropod-borne viral diseases caused by viruses belonging to the genus *Orbivirus* within the family *Reoviridae* and they are transmitted by certain species of biting midges belonging to the genus *Culicoides* (Holmes et al. 1995). In the eastern Mediterranean Basin, outbreaks where the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer has never been detected during insect surveys have been reported in Bulgaria, Serbia, Kosovo, Croatia, Montenegro, northern Greece, Bosnia Herzegovina, and more recently in Belgium, Germany, Holland, and France (Baylis and Mellor 2001, Mellor and Wittmann 2002, Purse et al. 2005, Meiswinkel 2006).

There are indications that species of the *Obsoletus* and/or *Pulicaris* complexes may play a role in bluetongue virus (family *Reoviridae*, genus *Orbivirus*, BTV) transmission. Indeed, species belonging to both complexes are present in large numbers in areas of BT transmission where *C. imicola* is not present. In addition, BTV was isolated from specimens belonging to these complexes during outbreaks in Cyprus, Italy (Mellor and Pitzolis 1979; Savini et al. 2003, 2005; Caracappa et al. 2003) and northern Europe (Meiswinkel 2006, Thiry et al. 2006). Moreover, oral susceptibility to BTV serotype 9 has recently been demonstrated from specimens belonging to *Obsoletus* and *Pulicaris* complexes (Carpenter et al. 2006), species widespread and abundant in the region and across most of northern Europe.

Culicoides chiopterus Meigen, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *Culicoides montanus* Shakirjanova, *Culicoides obsoletus* Meigen, and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle are usually referred to collectively as *Obsoletus* complex (Carpenter et al. 2006). Together with *C. imicola*, these five species are the only representatives of the subgenus *Avaritia* in France and western Europe. *C. obsoletus* and *C. scoticus* are found frequently in Bulgaria (Glouhova et al. 1991), northern Spain (Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003), and Italy (Savini et al. 2003). Very little information is available for the three other species belonging to the *Obsoletus* complex. Unfortunately, adult females of most of the five species belonging to the *Obsoletus*

¹ Entente InterDépartementale pour la déoustication, 165 Avenue Paul Rimbaud, 34184 Montpellier Cedex 4, France.

² CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France.

³ Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée Zoologique, 29 Bd de la Victoire, 67000 Strasbourg, France.

⁴ Corresponding author, e-mail: catherine.cetre-sossah@cirad.fr.

Table 1. Collection of *Culicoides* species used in this study for genomic DNA extraction and multiplex PCR amplification

<i>Culicoides</i> species	Collection locality	Geographic coordinate ^a	Collection date	Total no. of specimens	Homologies (%)
<i>C. chiopterus</i>	Geispolsheim	7° 38' 03" E, 48° 29' 35" N	3–4 June 2002	3	98.93
<i>C. dewulfi</i>	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	28–29 July 2004	1	99.10
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	7 May 2005	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	15 May 2005	1	
<i>C. montanus</i>	Cargèse	8° 37' 48" E, 42° 8' 57" N	17–18 Aug. 2004	1	98.47
	Fozzano	9° 00' 20" E, 41° 41' 22" N	17–18 June 2005	2	
<i>C. obsoletus</i>	Argels sur mer	3° 3' 6" E, 42° 31' 31" N	24–25 July 2003	1	99.43
	Castelet	5° 45' 31" E, 43° 12' 16" N	24–25 Oct. 2002	1	
	Jonquières	2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N	24–25 Oct. 2002	1	
<i>C. scoticus</i>	Roquette-sur-siagne	6° 56' 7" E, 43° 34' 38" N	28–29 June 2004	2	98.33
	Roquette-sur-siagne	6° 56' 7" E, 43° 34' 38" N	8–9 Aug. 2003	1	

^a Longitude/latitude, UTM WGS 84.

complex are morphologically similar and relatively difficult to distinguish. Males are usually distinguishable on the basis of certain characteristics of the genitalia (Kremer and Rebholz 1977, Delécolle 1985, Rawlings 1997), with few exceptions (Gomulski et al. 2005).

Due to similar difficulties in identification, the larval habitats used by members of the Avaritia group are not well characterized in Europe, although a general association with the farm habitat has been made in some cases (Kettle and Lawson 1952, Chaker and Kremer 1983, Hill 1947).

The identification of techniques that allow the swift and accurate taxonomic separation of the *Obsoletus* complex would assist both the identification of differences in adult ecologies within the group, with subsequent value for epidemiological studies of virus transmission, and additionally allow the identification of larvae without the need for successful rearing for identification purposes. The present work, based on previous studies about the development of diagnostic assays and phylogenetic analysis (Li et al. 2003, Cêtre-Sossah et al. 2004, Perrin et al. 2006) describes a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay based on internal transcribed spacer (ITS)-1 rDNA to distinguish adults of species belonging to the *Obsoletus* complex (*C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*).

Materials and Methods

Study Site. Based on the data collected in 2002 by the *Culicoides* surveillance network implemented in mainland France (Baldet et al. 2004), a sheep farm located 2° 42' 45" E, 43° 2' 17" N and known to support large numbers of midges of the *Obsoletus* complex was selected to provide individuals for analysis. Because a bivoltine activity of the adults of the *Obsoletus* complex species was observed similar to that of other Mediterranean countries (Calistri et al. 2003, Capela et al. 2003, Miranda et al. 2003, Sarto i Monteys and Saiz-Ardanaz 2003), most of the three specimens for each species were collected in spring and early autumn from geographically distinct populations (except for *C. dewulfi*) (Table 1).

Adult *Culicoides* samples used in this study were collected as described previously (Cêtre-Sossah et al. 2004). Identification of *Culicoides* was initially based upon the wing pattern and subsequently confirmed by mounting some specimens on microscope slides (Kremer 1965, Wirth and Marston 1968). The samples were identified morphologically and independently by two of us (B.M. and J.-C.D.) by using the keys of Campbell and Pelham-Clinton et al. 1960 and Delécolle 1985.

C. montanus and *C. chiopterus* were sequenced from female specimens stored in ethanol, whereas *Culicoides obsoletus* and *C. scoticus* were sequenced from male specimens. A xylene bath was used to extract female specimens of *C. dewulfi* from slides after identification.

Genomic DNA Extraction and Multiplex PCR Amplification. Three specimens of each *Culicoides* species were used for the DNA extraction (Table 1) with the DNeasy tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

The gene analysis software Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to compare the ITS-1 rDNA sequences of the five species of the *Obsoletus* complex for the design of primers. Table 2 lists the sequences of the six different primers used for the multiplex PCR. The five reverse diagnostic primers were designed to be used in the multiplex PCR with the Pan Cul-Forward primer (PanCulF), located in one of the most highly conserved regions (Cêtre-Sossah et al. 2004) to give a specific pattern of each of the species.

Reactions were performed in a total volume of 25 μ l consisting of 10 \times PCR reaction buffer; 1.5 mM MgCl₂; 250 μ M each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP (Eurobio, Les Ulis, France); 20 pmol of the primers Obs-ss-R, Obs-sl-R, Dewulfi-R, and Chiopterus-R; 40 pmol of Montanus-R; 60 pmol of Pan CulF; and 2.5 U of TaqDNA polymerase. A volume of 1 μ l of genomic DNA was added to each PCR reaction, and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carryover contamination. PCR was carried out with the following cycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min and then 30 cycles at 94°C, 1 min; 61°C, 1 min; 72°C, 1 min and a final extension phase at 72°C for 10 min. PCR products were

Table 2. Nucleotide sequence of the *Obsoletus* complex multiplex PCR primers

Primer ^a	Length (bases)	Tm value (°C)	Sequence
PanCulF	20	53.6	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'
Obs-sl-R	21	55.6	5'-TGAATCAGACACCCGCTTAA-'
Obs-ss-R	30	55.7	5'-ATCTTGATAAAAAATCAATGCATACACTCACT-'
Dewulfi-R	36	54.7	5'-CACACCATACACTATATAAGAATACATCATTATATT-'
Montanus-R	20	59.2	5'-CGAGCTGCAATGCCCAATGA-'
Chiopterus-R	21	56.4	5'-CGAGCTGCTATACCGAGGCAC-'

^a sl, sensu lato; ss, sensu stricto.

examined by electrophoresis in a 2.5% agarose gel with 0.0625% ethidium bromide.

The 30 species used for the specificity of the *Obsoletus* complex specific PCR assay were the following: *C. achrayi* Kettle & Lawson, *C. cataneii* Clastrier, *C. circumscriptus* Kieffer, *C. dendriticus* Boorman, *C. derisor* Callot & Kremer, *C. fagineus* Edwards, *C. festivipennis* Kieffer, *C. gejelensis* Dzharov, *C. griseidorsum* Kieffer, *C. heteroclitus* Kremer & Callot, *C. imicola* Kieffer, *C. indistinctus* Khalaf, *C. kibunensis* Tokunaga, *C. kurensis* Dzharov, *C. longipennis* Khalaf, *C. lupicaris* Downes & Kettle, *C. malevillei* Kremer & Coluzzi, *C. maritimus* Kieffer, *C. maritimus* variety *paucisensillatus* Callot, Kremer & Rioux, *C. newsteadi* Austen, *C. pallidicornis* Kieffer, *C. parroti* Kieffer, *C. pictipennis* Staeger, *C. picturatus* Kremer & Deduit, *C. pulicaris* Linné, *C. punctatus* Meigen, *C. puncticollis* Becker, *C. sahariensis* Kieffer, *C. subfagineus* Delecalle & Ortega, and *C. submaritimus* Dzharov.

Cloning and Sequencing of the ITS-1 Fragments. The purified PCR product was cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR cloning kit; Invitrogen), by using chemically competent *Escherichia coli*. To confirm the presence of the insert, PCR amplification with PanCulF/PanCulR primers was performed on 10 bacterial clones for each species. Three clones per specimen were kept for further analysis. The plasmid DNA was extracted using Plasmid DNA preparation kit (Nucleospin R Plasmid, Macherey Nagel, Easton, PA). Three clones for each of the three *Culicoides* specimens per species were sequenced with both PanCulF and PanCulR primers. An ITS-1 sequence was obtained for each single biting midge by alignment of the forward and reverse sequences.

Sequence Analysis and Alignment. A consensus ITS-1 sequence was generated from the nine different sequences obtained for each species (three distinct specimens with three clones for each specimen). The consensus sequences were submitted to GenBank with an appropriate accession number: *C. chiopterus*, DQ408543; *C. dewulfi*, DQ408545; *C. montanus*, DQ408544; *C. obsoletus*, AY861152; *C. scoticus*, AY861160; *C. imicola*, AY861144; and *C. newsteadi*, AY861151. This consensus sequence was used for the phylogenetic analysis.

The alignment of the forward and reverse sequences was performed using Vector NTI software (Invitrogen). Sequences from different midges were aligned using Clustal W (Thompson et al. 1994) included in Vector NTI, and base differences between sequences were identified. All sequences were aligned

without gaps. The identity of all polymorphic bases was checked against the original chromatograms. Intraspecific variation was found to be very low.

Phylogenetic Analysis. The alignment file format msf (*.msf) obtained after alignment by Vector NTI was converted into a phylip 3.2 format (*.phy) by using Bioedit software to allow phylogenetic analysis (Hall 1999). Neighbor-joining and Bayesian inference tree construction were used to test the robustness of phylogenies.

Phylogenetic analysis was first carried out using the neighbor-joining (Saitou and Nei 1987) method with Darwin software (Perrier et al. 2003). Distances were adjusted for multiple substitutions using Jukes and Cantor correction and generated with TreeCon MATRIXW program of Darwin (Van de Peer and De Wachter 1993). Bootstraps were determined on 2000 replicates.

Bayesian inference was performed using MrBayes version 3.0B4 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with random starting trees and run for 2,000,000 generations, sampling the Markov chains at intervals of 100 generations. Four heated Markov chains (using default heating values) were used. In total, 1,000 of the 20,000 resulting trees were discarded as "burn-in." Support for tree nodes was determined based on the values of bayesian posterior probability obtained from a majority-rule consensus tree. The analysis was repeated five times to confirm that the results converged to the same topology. The complete ITS-1 sequence of *C. newsteadi* (GenBank accession no. AY861151) was used as an outgroup.

Results and Discussion

Alignment of the ITS-1 rDNA of the Five Species Belonging to the *Obsoletus* Complex. Three specimens of each species taken from geographically separated sites (with the exception of the *C. dewulfi* samples, which came from a single site) were analyzed (Table 1) and formed distinct clusters.

The percentage of homology for each species *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus* was 98.93, 99.1, 98.47, 99.43, and 98.33, respectively, indicative of high sequence homologies within species. This observation had been already made on three specimens of *C. imicola* (99.8% homology) in a phylogenetic study published previously (Perrin et al. 2006). These high intraspecific homologies confirm that ITS-1 region, highly conserved among species trapped in different locations (except *C. dewulfi*

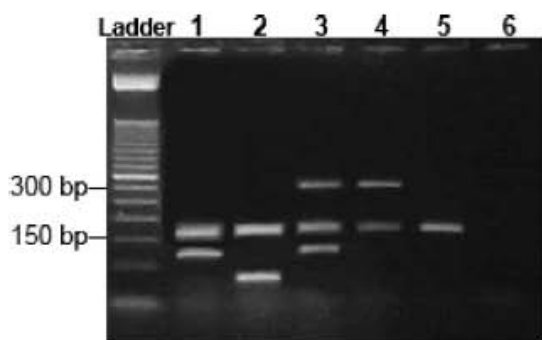


Fig. 1. Multiplex PCR analysis of adult *Culicoides* samples. Amplification of the ITS-1 of the five *Obsoletus* complex species. Ladder is a 50-bp DNA ladder (Invitrogen). Lanes 1–6 correspond to *C. chiopterus*, *C. dewulfi*, *C. montanus*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*, respectively. *C. imicola* is the negative control.

where all the specimens were captured in the same location), is useful for the development of a molecular detection tool and for phylogenetic analysis. The alignment of the ITS-1 sequences revealed three highly conserved regions, between 2 and 41 bp, 174 and 230, and 360 and 404 bp, respectively. In two of these highly conserved regions, two primers, PanCulF and Obs-sl-R, were designed and enabled the amplification of a common *Obsoletus* complex-specific band of around 160 bp present for the five species of the *Obsoletus* complex. Other variable regions were located at different positions in the sequences within the species (50–80, 95–120, and 260–300 bp), these regions were respectively used to design species specific primers (Dewulfi-R primer for the positions 50–80 bp, Montanus-R and Chiopterus-R primers for the positions 95–120 bp, and Obs-ss-R primer for the positions 260–300 bp). Although these samples were adequate to describe the French fauna, further samples from a wider geographic area would provide an interesting comparison of any intraspecific variation.

Molecular Detection of the *Obsoletus* Complex Species by Specific Multiplex PCR. To develop a specific molecular tool to distinguish the five species belonging to *Obsoletus* complex, preliminary PCR reactions were performed on adult specimens. Agarose gel electrophoresis showed highly specific PCR products for each of the species (Fig. 1). An *Obsoletus* complex-specific band was observed as a common band for the five species of the *Obsoletus* complex at ~166 bp. Additional bands leading to a specific pattern were amplified for the four other species. Only one additional, and specific, band was present at 78, 117, and 302 bp, respectively, for *C. dewulfi*, *C. chiopterus*, and *C. obsoletus*. For *C. montanus*, two specific amplified products at 125 and 302 bp were obtained. *C. scoticus* was the only species to be identified by the presence of the unique common band at 166 bp. As expected, no band was detected in the negative control (*C. imicola*) (Fig. 1, lane 6). The absence of the common *Obsoletus* complex species-specific band at ~170 bp excluded the presence of an *Obsoletus* com-

plex specimen in the samples. Additionally, none of the other commonly found species tested as part of standardizing the assay produced cross-reactions.

A specific molecular tool for the individual detection of the five species of the *Obsoletus* complex was thus developed with adult specimens. This method also can potentially be used to identify larval specimens and preliminary experiments have been encouraging (data not shown). In future studies, collection of a high number of adults specimens and single larvae in different sites with measurements of physical and chemical characteristics of soils (e.g., pH, conductivity and percentage of organic matter) will help to better characterize *Obsoletus* complex species biotopes. Species identification at the larval stage would allow a more thorough understanding of BT vector ecology.

Phylogenetic Status of *Avaritia* Subgenus Species Based on ITS-1 Sequences. We used the ITS-1 sequences of the *Obsoletus* complex species already published in GenBank (*C. obsoletus* and *C. scoticus*), the newly sequenced species generated in our laboratory (*C. dewulfi*, *C. chiopterus*, and *C. montanus*), and *C. imicola* (AY861144). Phylogenetic trees generated using neighbor-joining (Fig. 2A) and Bayesian inference (50% majority rule consensus tree; Fig. 2B) gave similar data.

The specimens belonging to the six species examined were grouped into five clusters by phylogenetic analysis. The first cluster includes both *C. obsoletus* and *C. montanus* and is supported by a 100% bootstrap value. Divergence between *C. obsoletus* and *C. montanus* is in turn supported with a bootstrap value of 63%. The four other clusters were monospecific, with *C. chiopterus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi*, and *C. imicola*. For these species, each cluster is supported by a 100% bootstrap value. Among the *Obsoletus* cluster complex, the *C. dewulfi* cluster is found closer to the *C. imicola* cluster. This phylogenetic proximity may explain the recent implication of *C. dewulfi* in The Netherlands outbreak (Meiswinkel 2006).

These results confirm a previous study on ITS-2 rDNA phylogenetic of *Obsoletus* complex where topologies on trees generated were similar where four distinct clusters were apparent, the first of which includes both *C. obsoletus* and *C. montanus*, whereas the others are formed by *C. scoticus* (89% bootstrap value), *C. dewulfi* (100% bootstrap value), and unidentified species A and B, respectively (Gomulski et al. 2005). This study provided no evidence, however, of subgroup discrimination between the *C. scoticus* and *C. dewulfi* species as found for the ITS-2 analysis. However, a significant bootstrap value higher than 50% was not obtained for ITS-2 to separate *C. obsoletus* and *C. montanus*. Gomulski et al. 2005 expressed a doubt upon identification of *C. montanus* captured in Italy because they did not find their specimen in altitude exceeding 2,000 m where this species was originally captured and described (Pamir, Tajikistan). Our specimens of *C. montanus* also were not trapped in France at this altitude. The confirmation of the close position between *C. obsoletus* and *C. montanus* and the significant bootstrap value between each other lead us to think

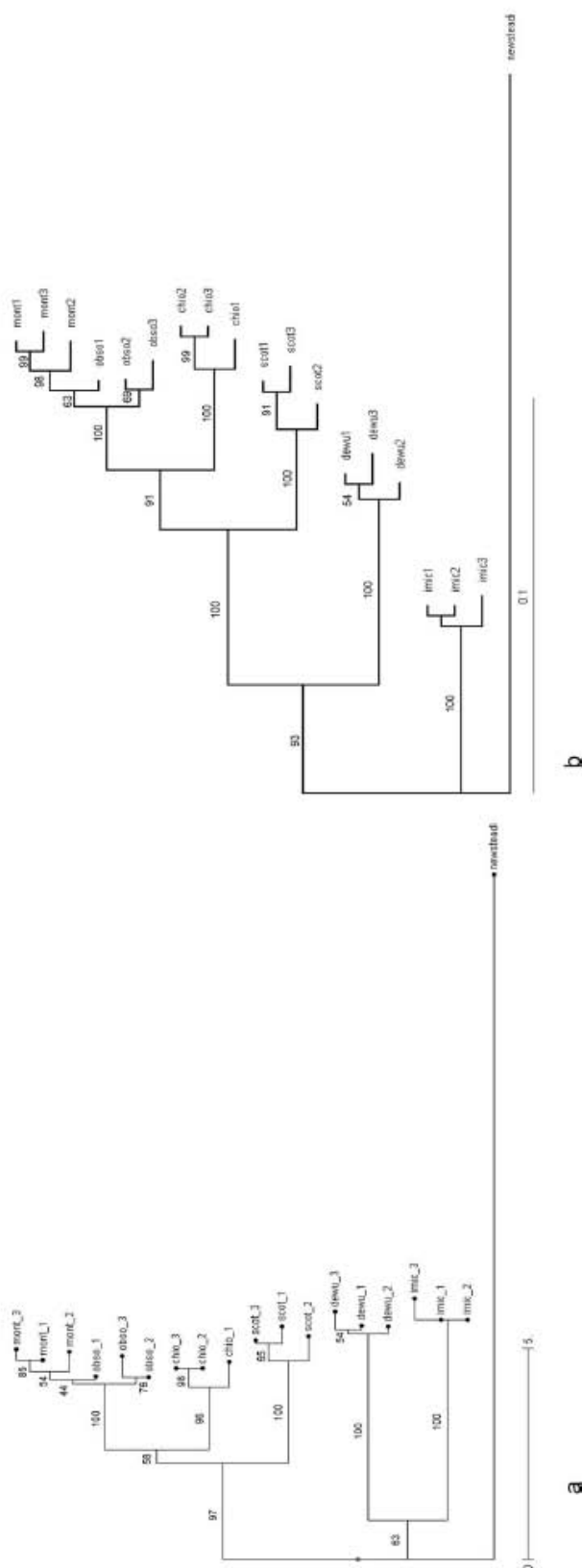


Fig. 2. Phylogenetic relationships among ITS-1 sequences of *Obsoletus* complex species. *chio*, *dewu*, *imic*, *mont*, *obso*, and *scot* stand, respectively, for *C. diopterus*, *C. deaulfi*, *C. micola*, *C. montana*, *C. obsoletus*, and *C. scoticus*. (A) Neighbor-joining tree based on ITS-1 sequences. Bootstrap values (2,000 replicates, nodes supported with >50%) are given on the branches. (B) Condensed Bayesian tree. Values are for posterior probability values (2,000,000 generations).

that the Italian and French specimens of *C. montanus* were thus correctly identified. However, as shown on the Fig. 2, A and B, specimen identified as obso 1 is placed in the cluster with the other three specimens of *C. montanus* in both trees, whereas the specimens identified as obso 2 and obso 3 are placed in another cluster in both trees. A larger number of specimens of the *C. montanus* and *C. obsoletus* from a wider geographic range would assist in resolving their close genetic relationship observed in this study.

Acknowledgments

Part of this project was funded by FNS-Institut National de la Recherche Agronomique-ACI, Ecologie quantitative-Ministère Français de la Recherche.

References Cited

- Baldet, T., J. C. Delécolle, B. Mathieu, S. De La Roque, and F. Roger. 2004. Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Vet. Ital.* 40: 226–231.
- Baylis, M., and P. S. Mellor. 2001. Bluetongue around the Mediterranean in 2001. *Vet. Rec.* 149: 659.
- Beckenbach, A. T., and A. Borkent. 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27: 21–35.
- Calistri, P., M. Goffredo, V. Caporale, and R. Meiswinkel. 2003. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J. Vet. Med.* 50: 132–138.
- Campbell, J. A., and E. C. Pelham-Clinton. 1960. A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proc. R. Soc. Edinb. B* 67: 181–302.
- Capela, R., B. V. Purse, I. Pena, E. J. Wittman, Y. Margarita, M. Capela, L. Romao, P. S. Mellor, and M. Baylis. 2003. Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Med. Vet. Entomol.* 17: 165–177.
- Caracappa, S., A. Torina, A. Guercio, F. Vitale, A. Calabro, G. Purpari, V. Ferrantelli, M. Vitale, and P. S. Mellor. 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet. Rec.* 153: 71–74.
- Carpenter, S., H. L. Lunt, D. Arav, G. J. Venter, and P. S. Mellor. 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J. Med. Entomol.* 43: 73–78.
- Cêtre-Sossah, C., T. Baldet, J. C. Delécolle, B. Mathieu, A. Perrin, C. Grillet, and E. Albina. 2004. Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the main vector of bluetongue and African horse sickness in Africa and Europe, by ITS1rDNA PCR amplification. *Vet. Res.* 35: 325–337.
- Chaker, E., and M. Kremer. 1983. Méthode d'étude des larves de stade IV du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 1: 11–16.
- Delécolle, J. C. 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Ph.D. dissertation, UFR Sciences de la Vie et de la Terre, Université Louis Pasteur de Strasbourg I, France.
- Glouhova, V. M., N. K. Nedelchev, I. Rousev, and T. Tanchev. 1991. On the fauna of blood sucking midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Bulgaria. *Vet. Sci.* 25: 63–66.
- Gomulski, L. M., R. Meiswinkel, J.C.D. Delécolle, M. Goffredo, and G. Gasperi. 2005. Phylogenetic relationship of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Syst. Entomol.*
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment [ed.], and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hill, M. A. 1947. The life-cycle and habits of *Culicoides impunctatus* and *C. obsoletus*, together with some observations on the life-cycle of *C. odibilis*, *C. pallidicornis*, *C. cubitalis* and *C. chiopterus*. *Ann. Trop. Med. Parasite* 41: 55–115.
- Holmes, I. H., G. Boccardo, M. K. Estes, and M. K. Furuchi. 1995. Family Reoviridae. In: *Virus Taxonomy, Classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer, Vienna, Austria 10: 208–239.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Kettle, D. S., and J.W.H. Lawson. 1952. The early stages of british biting midges *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) and allied genera. *Bull. Entomol. Res.* 43: 421–467.
- Kremer, M. 1965. Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. In *Encyclop. Entomol. Série A*, vol. 39. P. Lechevallier, Paris, France.
- Kremer, M., and C. Rebholz. 1977. Systematics of the obsoletus complex group of *Culicoides* (subgenus *Avaritia*) in the Palearctic region, with remarks on some types. *Mosq. News* 37: 278.
- Li, G. Q., Y. L. Hu, S. Kanu, and X. Q. Zhu. 2003. PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Vet. Parasitol.* 112: 101–108.
- Meiswinkel, R. 2006. The *Culicoides* vector of bluetongue disease in Limburg, The Netherlands. *Bluetongue-Europe* (14): new vector. (<http://www.promedmail.org>).
- Mellor, P. S., and J. Pitzolis. 1979. Observations and breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreaks of bluetongue in Cyprus. *Bull. Entomol. Res.* 69: 229–234.
- Mellor, P. S., and E. J. Wittmann. 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean basin 1998–2001. *Vet. J.* 164: 20–37.
- Miranda, M. A., D. Borrás, C. Rincon, and A. Alemany. 2003. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Med. Vet. Entomol.* 17: 52–54.
- Perrier, X., A. Flori, and F. Bonnot. 2003. Data analysis methods, pp. 43–76. In Enfield [ed.], *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Science Publishers, Montpellier, France.
- Perrin, A., C. Cêtre-Sossah, B. Mathieu, T. Baldet, J. C. Delécolle, and E. Albina. 2006. Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS-1rDNA sequences. *Med. Vet. Entomol.* 20: 219–228.
- Purse, B. V., P. S. Mellor, D. J. Rogers, A. R. Samuel, P. P. Mertens, and M. Baylis. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 171–181.
- Rawlings, P. 1997. A key based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille-Diptera-Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia* 52: 57–71.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.

- Sarto i Monteys, V., and M. Saiz-Ardanaz. 2003. *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Med. Vet. Entomol.* 17: 288–293.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, P. De Santis, and R. Meiswinkel. 2003. Transmission of bluetongue virus in Italy. *Vet. Rec.* 152: 119.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, A. Di Gennaro, M. A. Cafiero, L. Baldi, P. de Santis, R. Meiswinkel, and V. Caporale. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet. Rec.* 157: 133–139.
- Thiry, E., C. Saegerman, H. Guyot, P. Kirten, B. Losson, F. Rollin, M. Bodmer, G. Czaplicki, J. F. Toussaint, K. De Clercq, et al. 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet. Rec.* 59: 327.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Van de Peer, Y., and R. De Watchter. 1993. Treecon: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Appl. Biosci.* 9: 177–182.
- Wirth, W. W., and N. Marston. 1968. A method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61: 783–784.

Received 2 August 2006; accepted 12 January 2007.



Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS₁-rDNA sequences

A. PERRIN¹, C. CETRE-SOSSAH¹, B. MATHIEU³, T. BALDET¹,
J.-C. DELECOLLE² and E. ALBINA¹

¹CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, Montpellier, ²Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée zoologique, Strasbourg and ³Entente Interdépartementale pour la Démoustication, Montpellier, France

Abstract. Biting midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) play important roles in the transmission of viral diseases affecting wild and domestic ruminants and horses, including Bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) respectively. In southern Europe, BT has been largely transmitted by the classical Afro-Asian vector *Culicoides imicola* Kieffer. However, other species such as *C. obsoletus* Meigen, *C. scoticus* Downs & Kettle and *C. pulicaris* Linné may also be involved in BTV transmission. As a consequence of the discovery of *C. imicola* followed by BTV-2 outbreaks on the island of Corsica in October 2000, further studies on these biting midges have been carried out. To better characterize the evolution and phylogenetic relations of *Culicoides*, molecular analysis in parallel with a morphology-based taxonomic approach were performed. Phylogenetic analyses of French *Culicoides* species were undertaken using the ribosomal DNA (rDNA) internal transcribed spacer 1 (ITS₁) as a molecular target. This region was shown to be useful in understanding evolutionary and genetic relationships between species. Construction of several trees showed that molecular phylogeny within the genus *Culicoides* correlates not only with morphological-based taxonomy but also with ecological patterns.

Key words. *Culicoides* spp., African horse sickness, Bluetongue, internal transcribed spacer 1, phylogeny, France.

Introduction

Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are vectors of devastating viral diseases of livestock and wildlife, such as Bluetongue (BT), African horse sickness (AHS) and epizootic haemorrhagic disease of deer (EHD) (Du Toit, 1944; Tabachnick *et al.*, 1992; Mellor & Boorman, 1995; Mellor *et al.*, 2000). These diseases affecting ruminants and equines are caused by arthropod-borne viruses of the *Orbivirus* genus within the Reoviridae family (Holmes *et al.*, 1995). They are maintained in nature through series of alternating cycles of replication between its *Culicoides* vectors and susceptible hosts (Takamatsu *et al.*, 2003; White *et al.*, 2005). The health and economic impact of BT and AHS are important enough to include them within

the 15 priority diseases of list A of the 'Office International des Epizooties' (OIE, World Animal Health Organization).

BT is endemic in America, Australia, Asia and Africa. However, by 1999–2000 it had spread to southern Europe (Spain, France, Italy and Greece) where it has caused the death of one million sheep and an overall estimated economical loss of 300 000 euros/year (Tabachnick *et al.*, 1996; Mellor & Wittmann, 2002). The disease has now become endemic in Spain, France and Italy (Baylis, 2002; Sarto i Monteys *et al.*, 2005). The introduction of BT in Europe was the consequence of the spread of *Culicoides imicola* Kieffer from Africa. This species is now established in southern Europe. The reason for this recent northern extension of a tropical and subtropical vector is unknown but could be related to global warming (Purse *et al.*, 2005).

Correspondence: Catherine Cêtre-Sossah, CIRAD-EMVT, Campus International de Baillarguet, TA30/G, 34398 Montpellier Cedex 5, France, Tel.: + 33 467593724; fax: + 33 467593798; e-mail: catherine.cetre-sossah@cirad.fr

More than 1200 *Culicoides* species have been listed in the world (Borkent & Wirth, 1997) but only 17 have been associated with BTV transmission (Mellor, 1990; Mo *et al.*, 1994; Bi *et al.*, 1996; Sendow *et al.*, 1996; Sukarsik *et al.*, 1996; Venter *et al.*, 1998). The major vector species are *C. imicola* and *C. bolitinos* Meiswinkel in Africa, *C. imicola* in Asia, *C. brevitarsis* Kieffer in Australia, *C. sonorensis* Wirth & Jones in North America, *C. insignis* Lutz and *C. pusillus* Lutz in South and Central America and *C. imicola* in Europe (Meiswinkel, 1989; Mellor, 1990).

However, epidemiological field investigations and/or virus detections on *Culicoides* in the Mediterranean basin led to species other than *C. imicola* being suspected in the transmission of BT virus. These potential alternative vectors are members of the *Obsoletus* complex (Mellor & Pitzolis, 1979; Mellor & Wittmann, 2002) and *Pulicaris* complex (Wittmann & Baylis, 2000; Anon, 2001; Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003). De Liberato *et al.* (2005) have recently highlighted the abundance and the role of *C. obsoletus* as vector of bluetongue in Italy.

The discovery of *C. imicola* in the island of Corsica (France) in October 2000 (Zientara *et al.*, 2001; Delécolle & de La Rocque, 2002), followed by the emergence of BT outbreaks a few weeks later, and the relatively high risk of occurrence of this vector in neighbouring coastal mainland in southern France (Wittmann *et al.*, 2001; Tatem *et al.*, 2003) have resulted in the development of entomological surveys in these areas. For this purpose, a large light-trap network was established in 2002 in southern mainland France to survey the possible settlement of *C. imicola* and study the population dynamics of other potential vectors species: *Obsoletus* complex and *Pulicaris* complex (Baldet *et al.*, 2004). Besides the morphological determination of the different *Culicoides*, a better characterization of *C. imicola* was sought, particularly of the phylogenetic relationships between the different *Culicoides* species identified in Corsica and southern mainland France.

ITS₁ (internal transcribed spacer 1) located between genes 18S and 5.8S, on nuclear ribosomal DNA were chosen to be reliable molecular tools to work with because its structural and evolutionary properties are well known (Elder & Turner, 1995). In most cases, gene and ITS sequences at the many different copies of the ribosomal locus remain of a similar sequence composition (Ritchie *et al.*, 2004). It has to be mentioned here that some studies of spacer regions have found intragenomic diversity due to inefficiencies in homogenization (Schlötterer & Tautz, 1994), historical population fragmentation (Vogler & Desalle, 1994) or cryptic speciation (Leo & Barker, 2002). ITS₁ has already been used not only for different insects (Gentile *et al.*, 2002) but also for *Culicoides* (Li *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2004).

The aim of the present work was to assess the phylogenetic status of *C. imicola* within other native *Culicoides*. Molecular and morphological taxonomy of *Culicoides* were compared. Finally, potential relationships between phylogenetic analysis

and habitat characteristics of the *Culicoides* and also their potential role as bluetongue vectors are discussed.

Materials and methods

Traps and collection

To detect the introduction of *C. imicola* into mainland France at an early stage, 19 sites were selected for insect trapping. These sites were spread over 50-km intervals along the French Mediterranean coast. The collection was carried out at night once per month at each site from April to November 2002, using standard UV light-traps with a suction fan. Traps were set between 1 h before nightfall to around 8.00 h the following morning. They were located outdoors, 1.5–2 m above the ground and at 25 m maximum from livestock. A glass collecting beaker containing 200–300 mL of water (with a drop of detergent to reduce surface tension) was placed at the base of each trap. Insect collections were transported to the laboratory in the water-filled collecting beaker and then recovered and preserved in 90% ethanol. Ceratopogonidae were first isolated from all other insects. Identification of *Culicoides* was initially based upon the wing pattern, and confirmed subsequently by mounting some specimens on microscope slides (Kremer, 1965; Wirth & Marston, 1968). The samples were identified morphologically by two of the authors (B.M. and J.C.D.) using the keys of Campbell & Pelham-Clinton, 1960) and Delécolle (1985).

Extraction of genomic DNA

Three specimens of *Culicoides* species for most species were used for the extraction of DNA (see Table 1 for the number of specimens analysed per species depending on the availability of the midge). Total genomic DNA was extracted with the DNeasy Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.) according to the manufacturer.

Polymerase chain reaction primers

The gene analysis software Vector NTI (Invitrogen, CA, U.S.A.) was used to compare the ITS₁ rDNA sequences of the 11 species of *Culicoides* retrieved from GenBank/EMBL databases for the design of primers. A set of primers (PanCulF/PanCulR) was designed for a genus-specific polymerase chain reaction (PCR). The primers are PanCulF, 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3', a shorter version (at the 5' end) of the 18S universal primer used to amplify other arthropods including mites (Lava Kumar *et al.*, 1999), and PanCulR, 5'-TGCGGTCTTCATCGAACCCT-3', a *Culicoides* specific primer previously described (Cêtre-Sossah *et al.*, 2004).

Table 1. Collection of *Culicoides* species used in this study

<i>Culicoides</i> species	Collection locality	Geographic coordinate†	Total number of specimens	% homologies	Number of haplotypes
<i>C. cataneii</i>	Vence (06)	7°05'57" E/43°43'25" N	3	97.2%	5
<i>C. circumscriptus</i>	Lesey (57)	6°38'00" E/48°45'00" N	2	98.7%	3
<i>C. derisor</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. festivipennis</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	3	98.8%	4
<i>C. griseidorsum</i>	La Crau (83)	6°02'57" E/43°07'51" N	3	99.6%	3
<i>C. heteroclitus</i>	Roquebrune s/ Argens (83)	6°38'23" E/43°26'51" N	2	77.1%	3
<i>C. imicola</i>	Calvi (2A)	6°42'36" E/42°54'89" N	3	99.8%	3
<i>C. indistinctus</i>	Menton (06)	7°29'05" E/43°47'38" N	1*		
<i>C. kibunensis</i>	St Martin de Londres (34)	3°47'40" E/43°47'26" N	1*		
<i>C. kurensis</i>	St Mitre les remparts (13)	5°00'06" E/43°26'18" N	3	93.6%	4
<i>C. lupicaris</i>	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3	98.1%	4
<i>C. malevillei</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. maritimus</i>	Salses (66)	2°57'13" E/42°49'25" N	1	99.8%	4
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3		
<i>C. newsteadi</i>	St Mitre les remparts (13)	5°00'06" E/43°26'18" N	3	95.9%	5
<i>C. obsoletus</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	1	99.2%	7
	Castelet (83)	5°45'31" E/43°12'16" N	1		
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	2		
<i>C. parroti</i>	Les Pennes-mirabeau (13)	5°16'20" E/43°24'13" N	1	99.5%	4
	Jonquières (11)	2°42'45" E/43°02'17" N	3		
<i>C. pictipennis</i>	Geispolsheim (67)	7°38'04" E/48°29'05" N	3	95.2%	4
<i>C. picturatus</i>	Vidauban (83)	6°29'05" E/43°26'14" N	1*		
<i>C. pulicaris</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	3	95.9%	7
<i>C. punctatus</i>	Geispolsheim (67)	7°38'04" E/48°29'05" N	3	94.8%	4
<i>C. puncticollis</i>	Vic-la-Gardiole (34)	3°46'33" E/43°28'53" N	1	97.9%	4
	Aigues-Mortes (34)	4°09'26" E/43°33'38" N	2		
<i>C. sahariensis</i>	Portiragnes (34)	3°20'16" E/43°17'00" N	1	97.5%	3
	Vic la gardiole (34)	3°46'33" E/43°28'53" N	2		
<i>C. scoticus</i>	Roquette s/ Siagne (06)	6°56'07" E/43°34'38" N	2	93.8%	8
	Castelet (83)	5°45'31" E/43°12'16" N	2		
<i>C. subfagineus</i>	Argelès s/ mer (66)	3°03'06" E/42°31'31" N	3	96.6%	4
<i>C. submaritimus</i>	Salses (66)	2°57'13" E/42°49'25" N	3	99.2%	4

*Indicates the species where only one specimen was available.

†Longitude/latitude, UTM WGS 84.

Polymerase chain reaction amplification of internal transcribed spacer 1

The ITS₁ of each of the 25 species of *Culicoides* was amplified by genus-specific PCR using primers PanCulF/PanCulR. Reactions for the PanCulF/PanCulR primers were performed in a total volume of 50 µL consisting of 10 × PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer and 2.5 U Taq DNA polymerase under the following thermocycling conditions: an initial denaturation stage at 94°C for 5 min, then 30 cycles at [94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min] and a final extension phase at 72°C for 10 min. A volume of 1 µL of genomic DNA was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide and purified using PCR Purification Kit (Qiagen, U.S.A.) according to the manufacturer.

Cloning the internal transcribed spacer 1 fragments

The purified PCR product was cloned into PCR-Blunt vector (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), using chemically competent *Escherichia coli*. To confirm the presence of the insert, PCR amplification with PanCulF/PanCulR primers was performed on 10 bacterial clones for each species. Three plasmids per specimen were kept for further analysis. The plasmid DNA was extracted using Plasmid DNA Preparation Kit (Nucleospin R Plasmid, Macherey Nagel, Düren, Germany).

Sequencing

Three clones for each of the three *Culicoides* specimens per species (for most species) were sequenced with both PanCulF and PanCulR primers. Reactions were performed with the ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, MA, U.S.A.) in a total

4 A. Perrin et al.

volume of 20 µL consisting of 5 × buffer, 3.2 pmol of each primer, 2.5 U of BigDye mix and 300 ng of DNA.

DNA products were precipitated (2 µL of sodium acetate 3 M, pH 4.6, and 40 µL of absolute ethanol) and washed in 70% ethanol. The pellet was resuspended in a final volume of 4 µL (mix of 5 vol. of formamide and 1 vol. of EDTA/blue dextran) and loaded on Automatic sequencer ABI Prism 377.

Sequence analysis and alignment

A consensus ITS₁ sequence was obtained from the nine different sequences (three distinct specimens with three clones for each specimen) and submitted to GenBank with an appropriate accession number (Table 2). This consensus sequence was the one used for the phylogeny.

Table 2. GenBank accession numbers of previously and newly sequenced *Culicoides* species

<i>Culicoides</i> species	Accession number
Previously sequenced	
<i>C. albicans</i>	AJ417980
<i>C. arakawai</i>	AJ489503
<i>C. cubitalis</i>	AJ417979
<i>C. griseus</i>	AJ417987
<i>C. impunctatus</i>	AJ417986
<i>C. maritimus</i>	AJ417981
<i>C. nubeculosus</i>	AJ417982
<i>C. pulicaris</i>	AJ417983
<i>C. punctatus</i>	AJ417984
<i>C. variipennis</i>	U48380
<i>C. imicola</i>	AF071949
Newly sequenced	
<i>C. catanei</i>	AY861139
<i>C. circumscriptus</i>	AY861163
<i>C. derisor</i>	AY861140
<i>C. festivipennis</i>	AY861141
<i>C. griseidorsum</i>	AY861142
<i>C. heteroclitus</i>	AY861143
<i>C. imicola</i>	AY861144
<i>C. indistinctus</i>	AY861145
<i>C. kibunensis</i>	AY861146
<i>C. kurensis</i>	AY861147
<i>C. lupicaris</i>	AY861148
<i>C. malevillei</i>	AY861149
<i>C. maritimus</i>	AY861150
<i>C. newsteadi</i>	AY861151
<i>C. obsoletus</i>	AY861152
<i>C. parroti</i>	AY861153
<i>C. pictipennis</i>	AY861154
<i>C. picturatus</i>	AY861155
<i>C. pulicaris</i>	AY861156
<i>C. punctatus</i>	AY861157
<i>C. puncticollis</i>	AY861158
<i>C. sahariensis</i>	AY861159
<i>C. scoticus</i>	AY861160
<i>C. subfagineus</i>	AY861161
<i>C. submaritimus</i>	AY861162

The alignment of the forward and reverse sequences was performed using Vector NTI software (Informax Inc.). Sequences from different midges were aligned and base differences between sequences identified. All sequences were aligned without gaps. The identity of all polymorphic bases was checked against the original chromatograms. Intraspecific variation is very low. The file format msf (*.msf) obtained after alignment by Vector NTI was converted in a phylip 3.2 format (*.phy) using BIOEDIT software to allow phylogenetic analysis (Hall, 1999).

Phylogenetic analysis

Different methods of tree constructions were performed to probe the robustness of our resulting hypotheses. These methods were neighbour-joining, maximum likelihood and a Bayesian inference. Phylogenetic analysis was carried out using the neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) method with Darwin software (Perrier *et al.*, 2003). Distances were adjusted for multiple substitutions using Jukes and Cantor correction and generated with TREECON MATRIXW program of Darwin (Van de Peer & De Wachter, 1993). Bootstraps were determined on 2000 replicates.

Bayesian inference was performed using MRBAYES version 3.0B4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) with random starting trees and run for 2 000 000 generations, sampling the Markov chains at intervals of 100 generations. Four heated Markov chains (using default heating values) were used. A total of 1000 out of the 20 000 resulting trees were discarded as 'burn-in'. Support for tree nodes was determined based on the values of Bayesian posterior probability (BPP) obtained from a majority-rule consensus tree. We repeated the analysis five times to confirm that the results converged to the same topology.

Maximum likelihood (Felsenstein, 1973, 1981, 1988) analysis was performed using PHYLIP (DNAML program). Nodal support was estimated by bootstrap analysis (SEQBOOT option). The complete ITS₁ sequence of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) (GenBank Accession Number: X67157) was used as the outgroup.

Statistics

To get an overall analysis, all data molecular sequencing, ecology and taxonomy were combined using multiple correspondence statistical analysis with the R 2.0-1 package and ade4 1.3-3 library. This program is used for analysis of environmental data (Tenenhaus & Young, 1985; Lebart *et al.*, 1995). The aim of the analysis is to separate the modalities of variables in the best way and to generate distinct groups. Multiple correspondence analysis (MCA) aim is to generate quantitative scores, which maximize the mean correlation ratio among complex quantitative variables.

Results and discussion

Collection of *Culicoides*

The genus *Culicoides* in this study was represented by 25 species whose specimens were collected between 2002 and 2004 in different geographical locations (Table 1). The *C. imicola* specimen used as reference was collected in Corsica in 2002. All specimens gave amplified ITS₁ products between 300 and 500 bp.

Internal transcribed spacer 1 polymerase chain reaction amplification and sequences of *Culicoides*

In order to determine the position of the newly introduced *C. imicola* within other *Culicoides* species present in France, we sequenced ITS₁ regions and performed phylogenetic analysis on these sequences. This ITS₁ region was chosen based on previous works demonstrating the possibilities of phylogenetic analysis on *Culicoides* (Li *et al.*, 2003; Ritchie *et al.*, 2004). ITS₁ sequences from each of the 25 specimens listed in Table 1 were generated by PCR using PanCulF and PanCulR primers (previously described in Cêtre-Sossah *et al.*, 2004). The previously published ITS₁ sequences were retrieved from GenBank (Table 2).

Variations were first observed between sequences from species already published and some of the sequences presented here, leading to different positions in the trees. The *Maritimus* Kieffer ITS₁ sequence specimen retrieved from GenBank (AJ417981) was only 57% homologous with the specimen we have analysed. However, different specimens of *C. maritimus* were analysed and it was found that they were more than 99.8% homologous. In addition, the GenBank sequence of *C. maritimus* [named *C. maritimus* (2) in Fig. 1] could be considered as an out-group compared to all other *Culicoides*, thus strongly suggesting that this sequence is not reliable, probably because of a misidentification of the species. Different species in the *C. maritimus* complex have been described and are difficult to differentiate (*C. maritimus* ss, *C. maritimus paucisensillatus* for example). A more limited sequence variation was observed within the species *C. pulicaris* and *C. punctatus*, with 87% and 66% of homology, respectively. These differences may be due either to the different geographical distribution of the two specimens of each species (France vs. Scotland), showing that they are issued from two different genotypes, or to the problem of morphological identification. The species *C. cubitalis* and *C. kibunensis* were expected to be identical, which was actually not the case (67.7% of homology). To illustrate the complexity of *Culicoides* identification, another complex occurring in the U.S.A., the *Variipennis* complex is also made of five different species, called *C. variipennis albertensis* (found in the U.S.A. mid-west), *C. variipennis australis* (south-east U.S.A.), *C. variipennis occidentalis* (west and pacific coast U.S.A.), *C. variipennis sonorensis* (south-west U.S.A.), *C. variipennis variipennis* (north-east U.S.A.) (Raich *et al.*, 1993). *Culicoides* species among *Culicoides*

complexes are difficult to differentiate. Taxonomists who are able to manage the specific identification among sibling species are very few, which may easily lead to misidentification (Gomulski *et al.*, 2005).

In order to look at the possible variation within the same species of *Culicoides*, three specimens of *C. imicola* collected in Corsica were analysed and a 99.8% ITS₁ sequence homology was shown. In addition, sequencing of two different specimens collected in the south and the north of Corsica of the same species, has confirmed the conservation of the sequence within a species (data not shown). This illustrates the interest of ITS₁ for the differentiation of species. However, the same target is not appropriate for refined discrimination among specimens of the same species. Ritchie *et al.* (2004) showed that individuals of eight *Culicoides impunctatus* populations, including four geographical areas, appear to have homogenized ITS regions; however, heterogeneity in *C. impunctatus* specimens suggests one genetically distinct population.

Phylogenetic status of *Culicoides*

ITS₁ sequences of the *Culicoides* species already published in GenBank and our new sequences were used for this phylogenetic analysis. Very high sequence homologies percentages were obtained among specimens of each species (Table 1). Maximum likelihood, neighbour-joining and Bayesian inference trees were then inferred and tree topologies were analysed using bootstrapping. ITS₁ sequence of *Anopheles gambiae* (GenBank accession number X67157) was used as outgroup in order to root the tree.

Phylogenetic trees generated using the neighbour-joining (Fig. 1), the Bayesian inference (50% majority rule consensus tree, Fig. 2) and the maximum likelihood methods (best maximum likelihood tree, Fig. 2) were very similar. Bootstrap values from the NJ analysis are indicated above the branches on Fig. 1. Bootstrap values from the maximum likelihood analysis and posterior probabilities for Bayesian analysis are indicated, respectively, above and under the branches of the tree on Fig. 2. They both contained eight (nine for Bayesian inference/maximum likelihood trees) separate clades classifying 31 species. Only five species among the 36 analysed were dispersed all over the classification. Four distinct ecological groups related to some of the clades were also defined. The first ecological group is considered to be halophilic: the species included in this group breeds in saline or brackish substrate. The second group is characterized by species living in altitude and in environments poor in organic materials. The third group includes species living in livestock rearing environment (effluent, manure) and the last one is characterized by environments rich in organic substances.

The eight different clades and their connection to the four ecological groups are described as follows. Clade I contains *C. subfagineus* Delécolle & Ortega 1998 and *C. newsteadii* Austen 1921. These two palearctic species belong to the same subgenus *Culicoides* as species from

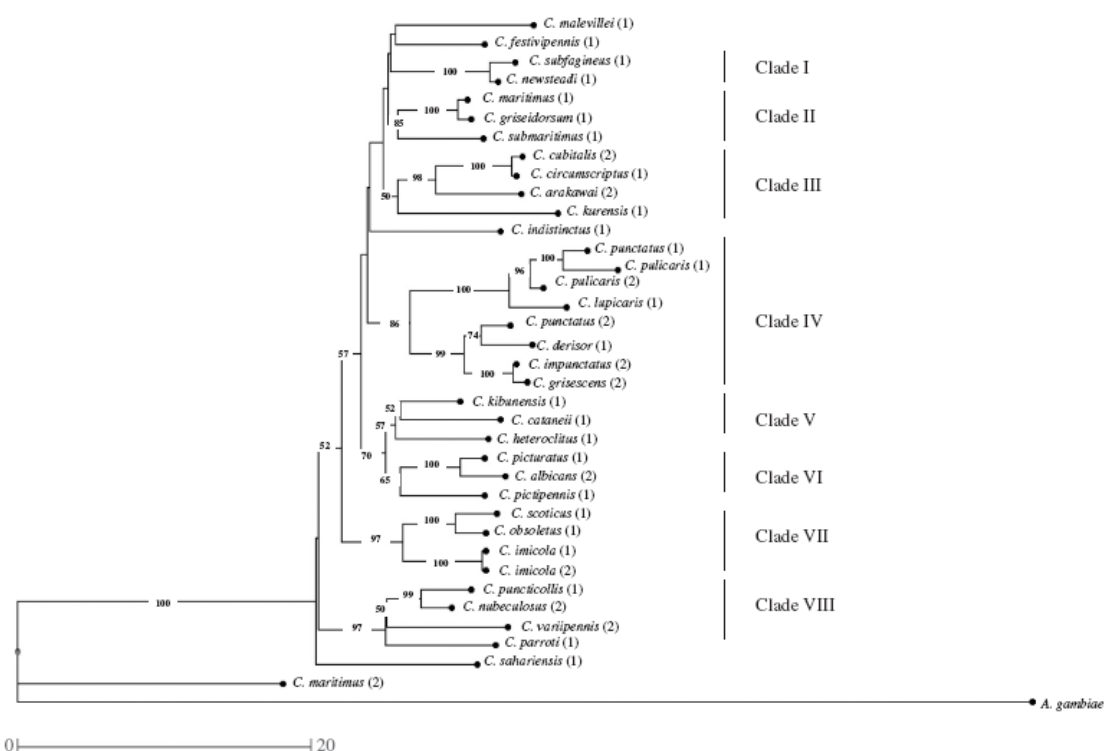


Fig. 1. Phylogenetic relationships among internal transcribed spacer 1 (ITS₁) sequences of *Culicoides* from France. Neighbour-joining tree based on ITS₁ sequences. Bootstrap values (2000 replicates, nodes supported with more than 50%) are given on the branches. The numbers indicated in brackets correspond to (1) the specimens already published in GenBank and (2) the specimens analysed within this work.

clade IV; however, *C. subfagineus* and *C. newsteadi* do not have the same larvae habitat. *C. subfagineus* is probably a species living in wood moisture as *C. fagineus* (a sibling species) whereas *C. newsteadi* is a halophilic species (breeding in saline or brackish substrate), corresponding to the first ecological group.

Clade II contains *C. griseidorsum* Kieffer belonging to *griseidorsum* group, *C. maritimus* and *C. submaritimus* Dzshafarov (both in *maritimus* group). These three species are halophilic, which correspond to the first described ecological group.

Clade III consists of four species: *C. cubitalis* Edwards, recently renamed *kibunensis* Tokunaga (Kibunensis group), *C. circumscriptus* Kieffer (subgenus *Beltranmyia* Vargas, 1953), *C. arakawai* Arakawa (subgenus *Meijerehelea*) and *C. kurensis* Dzshafarov (Kurensis group). *C. arakawai* is an oriental species that has never been reported in Palearctic area. *C. circumscriptus* breeds in brackish substrate, whereas *C. kibunensis* is a species living in fresh water.

Clade IV consists of *C. lupicaris* Downes and Kettle, *C. pulicaris* Linné, *C. punctatus* Meigen, *C. impunctatus* Goetghebuer, *C. griseocens* Edwards and *C. derisor* Callot and Kremer. In maximum likelihood/Bayesian inference

tree this clade is subdivided in two separate branches. All these species belong to the subgenus *Culicoides* except *C. derisor*, which does not belong so far to any morphological classification due to its lack of wing patterns. Clade IV contains species corresponding to the second described ecological group (in altitude and poor in organic substances).

Clade V is characterized by the presence of *C. heteroclitus* Callot & Kremer (Kibunensis group), *C. cataneii* Clastrier (Cataneii group) and *C. kibunensis* Tokunaga (Kibunensis group).

Clade VI includes three species: *C. picturatus* Kremer & Deduit (subgenus *Silvaticulicoides*), *C. pictipennis* Staeger (*Pictipennis* group), *C. albicans* Winnertz (Vexans group). Larvae environment of species of clade V and clade VI is unsalted substrates.

Clade VII contains *C. obsoletus* Meigen, *C. scoticus* Downes & Kettle and *C. imicola* Kieffer. *C. imicola* is well known as a competent vector of orbiviruses (bluetongue and African horse sickness), whereas *C. obsoletus* and *C. scoticus* (Obsoletus complex) are only suspected vectors for bluetongue (Caracappa *et al.*, 2003; Savini *et al.*, 2003; De Liberato *et al.*, 2005). The habitat of these species is not

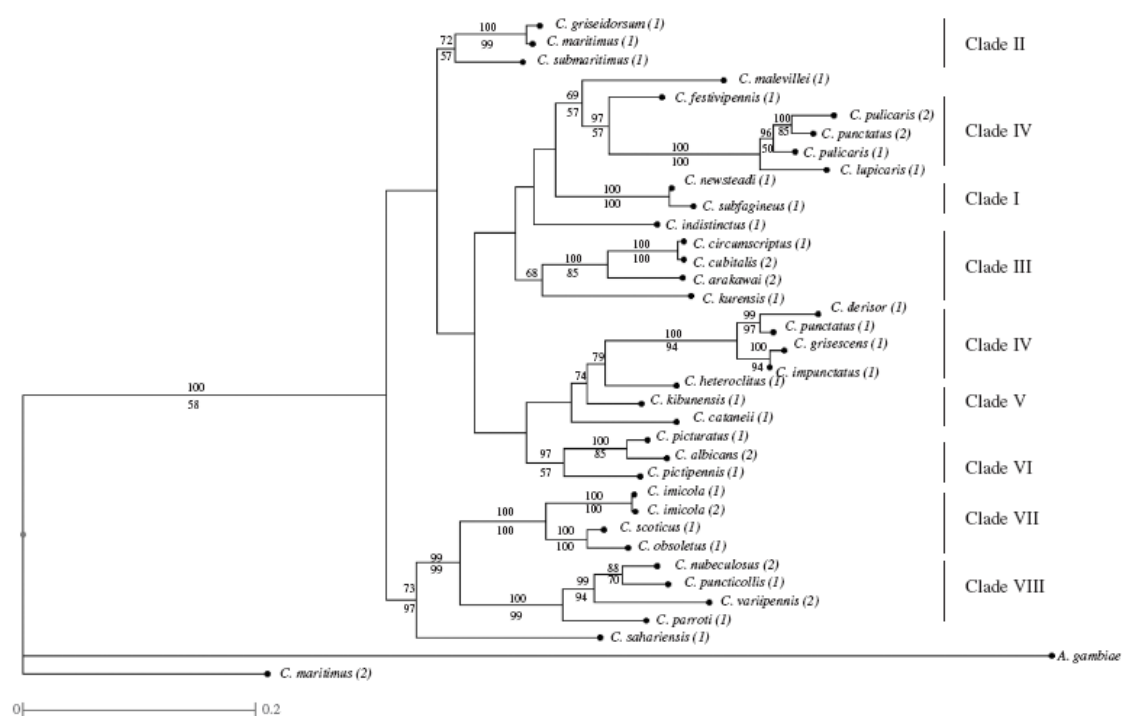


Fig. 2. Phylogenetic relationships among internal transcribed spacer 1 (ITS₁) sequences of *Culicoides* from France. Condensed Bayesian and maximum likelihood tree. Values above the nodes are for posterior probability values (2 000 000 generations), and numbers below the nodes are bootstraps values for maximum likelihood analysis (1000 replicates). The details corresponding to each *Culicoides* specimen are given in Table 1.

clearly defined but is probably related to livestock rearing environments (effluent, manure, moist organically enriched soil) corresponding to the third ecological group. Those three species belong to the same subgenus *Avaritia* Fox, like all species included in the *Imicola* complex. *Imicola* complex is currently represented by 10 species (Sebastiani *et al.*, 2001). Of these 10 species, seven are described: *C. imicola sensu stricto* Kieffer, *C. brevitarsis* Kieffer in Australasia; *C. pseudopallidipennis* Clastrier, *C. nudipalpis* Delfinado, *C. bolitinos* Meiswinkel in southern Africa, *C. miombo* Meiswinkel, *C. loxodontis* Meiswinkel and three undescribed species: *Culicoides* sp. #30 (*C. tuttifrutti* Meiswinkel 1995), *Culicoides* sp. #103 and *Culicoides* sp. #107 (*C. kwagga*, Meiswinkel, 1995). ITS₁ sequences from the following species *C. bolitinos*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus*, *C. actoni* and *C. wadai* all included in the same subgenus *Avaritia* are also considered as vectors of bluetongue in their respective geographical area. It could be interesting, besides the morphological taxonomy, to get an extended phylogenetic analysis of those species belonging to the same subgenus.

Clade VIII contains *C. variipennis* Coquillett – a Nearctic species that has never been found in the Palaearctic area, *C. nubeculosus* Meigen, *C. puncticollis* Becker and *C. parroti* Kieffer. All these species belong to the same subgenus

Monoculicoides and live in environments rich in organic substances, corresponding to the last ecological group.

Finally, *C. festipennis* Kieffer, belonging to Festipennis group, *C. malevillei* Kremer & Coluzzi in Malevillei group, *C. sahariensis* Kieffer in Sahariensis group, *C. indistinctus* in Odiatus group and *C. maritimus* (GenBank: AJ417981) are not included in the 8/9 separate clades described previously. The sequencing of more *Culicoides* species will probably give more branches for these particular groups that could lead to the identification of new clades.

The construction of the phylogenetic trees by two different methods demonstrates similar data and it is therefore possible to easily confirm the position of *C. imicola* in a single clade (clade VII) including *C. scoticus* and *C. obsoletus*; all three species were confirmed or suspected to be bluetongue vectors. Also, they probably breed in the same environment, moist organically enriched soil with tolerance of fairly wide climatic variation.

Multiple correspondence analyses

To combine morphological and molecular analysis and the habitat profile of the *Culicoides* species included in this

study, a multiple correspondence analysis (MCA) was carried out. This MCA was done on the 35 species grouped into clades according to the phylogenetic analysis. *C. derisor* was excluded from MCA because taxonomic and habitat information was missing. As shown in Fig. 3, MCA gave four clusters. Cluster 1 includes *C. imicola*, *C. scoticus* and *C. obsoletus*, which are the three species involved in bluetongue transmission, either as proved or suspected vectors, more likely breeding in the same biotope. Cluster 2 contains eight different species that are halophilic species found in the Mediterranean area: *C. circumscriptus*, *C. puncticollis*, *C. parroti*, *C. maritimus*, *C. griseidorsum*, *C. submaritimus*, *C. nubeculosus* and *C. variipennis*. They all belong to the *Monoculicoides* subgenus and Maritimus group.

Cluster 3 includes 13 species: *C. subfagineus*, *C. festivipennis*, *C. griseocens*, *C. cubitalis*, *C. kibumensis*, *C. impunctatus*, *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. picturatus*, *C. pictipennis*, *C. albicans* and *C. newsteadi*. Most of the species included in this cluster belong to the *Culicoides* subgenus and are found in the Palearctic area and are more likely breeding in fresh environments with low salt concentrations. The last cluster, cluster 4, includes the six following species: *C. arakawai*, *C. kurensis*, *C. indistinctus*, *C. sahariensis*, *C. catanii* and *C. heteroclitus* and is considered as a heterogenic cluster.

This MCA confirms the results shown by the phylogenetic trees, showing the distribution of four different

clusters, with cluster 1 in particular including the three potential or confirmed bluetongue vectors species.

Grouping of *Culicoides* species by molecular analysis of ITS₁ sequences was shown to be in agreement with the morphological taxonomy. This illustrates that ITS₁ can be used as a discriminating tool for *Culicoides* differentiation, in complement or in combination with the morphological determination which remains to be the gold standard for *Culicoides* species identification. Molecular grouping was also found to correlate with data on the habitat of *Culicoides*. For larvae identification, morphology-based distinction between species is very hard because no significant and specific differences among larvae have been described so far. In this case, ITS₁ analysis can represent an alternative tool for a better characterization of the species collected in a particular environment. This will help in increasing the knowledge on the habitat and bioecology of these midges.

Interestingly, the molecular analysis of ITS₁ has grouped *C. imicola*, a true vector of orbiviruses, with two other suspected vector species, *C. obsoletus* and *C. scoticus*, into the same cluster. This shows that these three species are genetically more closely related between them than with other species and because of this proximity, they may share some features, such as a common habitat and competence for orbivirus transmission. Confirmation of the latter possibility is urgent because it may have important consequences of disease spread, *C. obsoletus* being largely

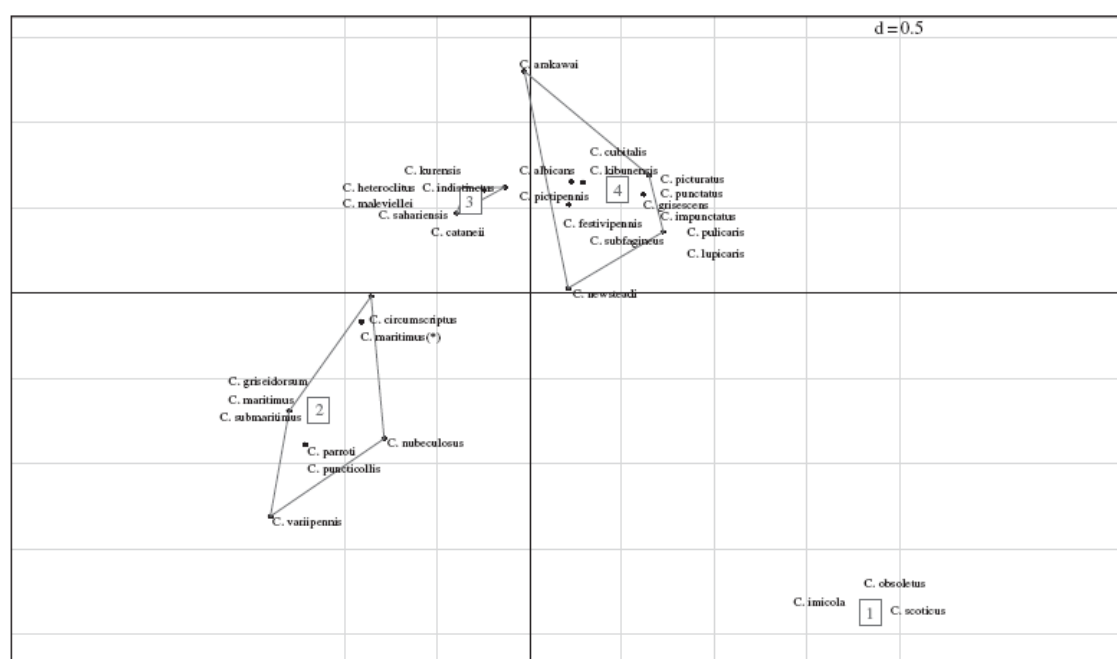


Fig. 3. Multiple correspondence analysis for *Culicoides* data (molecular, ecological and morphological data). The asterisk (*) indicates the specimen already published in GenBank.

the most important and widespread *Culicoides* in Europe (Mellor & Wittmann, 2002).

ITS₁ sequences have been shown to be good phylogenetic markers and could help to produce a bar-coding for each described *Culicoides* species. The description of their biotope and biology can be more challenging if the molecular tools to confirm classification pattern are available.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mr J. Lefebvre from DDSV 2B and Mr G. Bousquet from DDSV 2A for catches in Corsica. Part of the project was funded by FNS-INRA-ACI Ecologie quantitative-Ministère Français de la Recherche.

References

- Anon. (2001) Bluetongue in Bulgaria: follow-up report No. 1. *OIE Disease Information*, 14, 230–1.
- Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., De La Rocque, S. & Roger, F. (2004) Entomological surveillance of bluetongue in France in 2002. *Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, Spain*, 40, 226–231.
- Baylis, M. (2002) The Re-emergence of Bluetongue. *Veterinary Journal*, 164, 5–6.
- Bi, Y., Li, C., Li, S., Qing, B., Zhong, N., Hu, J. & Yang, R. (1996) An epidemiological survey of bluetongue in Yunnan Province, China. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific*, ACIAR Proceedings No. 66 (ed. by T. D. George and P. Kegeo), pp. 51–56. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Borkent, A. & Wirth, W.W. (1997) World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 233, 1–257.
- Campbell, J.A. & Pelham-Clinton, E.C. (1960) A taxonomic review of the British species *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh B*, 67, 181–302.
- Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A. et al. (2003) Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Veterinary Record*, 153, 71–74.
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J.C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C. & Albina, E. (2004) Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary Research*, 35, 325–37.
- De Liberato, C., Scavia, G. & Lorenzetti, R. et al. (2005) Identification of *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Veterinary Record*, 156, 301–4.
- Delécolle, J.C. (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. PhD Dissertation, Université Louis Pasteur de Strasbourg, UFR Sciences de la vie et de la terre, Strasbourg.
- Delécolle, J.C. & de La Rocque, S. (2002) Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 107, 371–379.
- Du Toit, R.M. (1944) The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 19, 7–16.
- Elder, J.F. & Turner, B.J. (1995) Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quarterly Review of Biology*, 70, 297–320.
- Felsenstein, J. (1973) Maximum likelihood estimation of evolutionary trees for continuous characters. *American Journal of Human Genetics*, 25, 471–492.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368–376.
- Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inferences and reliability. *Annual Review of Genetics*, 22, 521–565.
- Gentile, G., Della Torre, A., Maegga, B., Powell, J.R. & Caccone, A. (2002) Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s. and the problem of taxonomic status. *Genetics*, 161, 1561–1578.
- Gomulski, L.M., Meiswinkel, R., Delécolle, J.-C., Goffredo, M. & Gasperi, G. (2005) Phylogenetic relationships of the subgenus *Avaritia* Fox, 1955 including *Culicoides obsoletus* (Diptera, Ceratopogonidae) in Italy based on internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Systematic Entomology*, 30, 619–631. 10.1111/j.1365-3113.2005.00286.x
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Holmes, I.H., Boccardo, G., Estes, M.K. & Furuichi, M.K. (1995) Family Reoviridae. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*, Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ed. by F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop and S. A. Ghabrial), Vol. 10, pp. 208–239. Springer, Vienna, Austria.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Kremer, M. (1965) Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France. *Encyclopédie d'Entomologie Série A* (ed. by P. Lechevallier), Vol. 39, p. 299. P. Lechevallier Paris.
- Lava Kumar, P., Fenton, B. & Jones, A.T. (1999) Identification of cecidophyopsis mites (Acari: Eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect Molecular Biology*, 8, 347–357.
- Lebart, L., Morineau, A. & Piron, M. (1995) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, 2nd edn. Dunod, Paris.
- Leo, N. & Barker, S.C. (2002) Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the human louse: ITS2 is not suitable for phylogeographic studies of this species. *Insect Molecular Biology*, 11, 651–657.
- Li, G.Q., Hu, Y.L., Kanu, S. & Zhu, X.O. (2003) PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawae*. *Veterinary Parasitology*, 112, 101–8.
- Meiswinkel, R. (1989) Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 56, 23–39.

- Mellor, P.S. (1990) The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 162, 143–161.
- Mellor, P.S. & Boorman, J. (1995) The transmission and geographical spread of African Horse sickness and Bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 89, 1–15.
- Mellor, P.S. & Pitzolis, J. (1979) Observations and breeding sites and light-trap collections of *Culicoides* during an outbreaks of bluetongue in Cyprus. *Bulletin of Entomological Research*, 69, 229–234.
- Mellor, P.S. & Wittmann, E.J. (2002) Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001. *Veterinary Journal*, 164, 20–37.
- Mellor, P.S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, 45, 307–340.
- Mo, C.L., Thompson, L.H., Homan, E.J., Oviedo, M.T., Greiner, E.C., Conzaes, J. & Saenz, M.R. (1994) Bluetongue virus isolation from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. Interamerica Bluetongue Team. *American Journal of Veterinary Research*, 55, 211–215.
- Perrier, X., Flori, A. & Bonnet, F. (2003) Data analysis methods. *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants* (ed. by P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier and J. C. Glaszmann), pp. 43–76. Enfield Science Publisher, Montpellier, France.
- Purse, B.V., Mellor, P.S., Rogers, D.J., Samuel, A.R., Mertens, P.P. & Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews. Microbiology*, 3, 171–81.
- Raich, T.J., Archer, J.L., Robertson, M.A., Tabachnick, W.J. & Beaty, B.J. (1993) Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *Journal of Medical Entomology*, 30, 228–32.
- Ritchie, A., Blackwell, A., Malloch, G. & Fenton, B. (2004) Heterogeneity of ITS1 sequences in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Goetghbuer) suggests a population in Argyll, Scotland may be genetically distinct. *Genome*, 47, 546–558.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sarto i Montes, V., Ventura, D., Pages, N., Aranda, C. & Escosa, R. (2005) Expansion of *Culicoides imicola*, the main bluetongue virus vector in Europe; into Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, 1256, 415–417.
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., de Santis, P. & Meiswinkel, R. (2003) Transmission of bluetongue virus in Italy. *Veterinary Record*, 152, 119.
- Schlötterer, C. & Tautz, D. (1994) Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Current Biology*, 4, 77–783522.
- Sebastiani, F., Meiswinkel, R., Gomulski, L.M., Guglielmino, C.R., Mellor, P.S., Malacrida, A.R. & Gasperi, G. (2001) Molecular differentiation of the Old World *Culicoides imicola* species complex (Dipt. Cerato.) inferred using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular Ecology*, 10, 1773–1786.
- Sendow, I., Sukarsih, S.E., Soleha, E., Pearce, M., Bahri, P.W. & Daniels, P.W. (1996) Bluetongue virus research in Indonesia. *Bluetongue Disease in Southeast Asia and the Pacific* ACIAR Proceedings No. 66 (ed. by T. D. George and P. Kegeo), pp. 28–32. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Sukarsik, S.E., Daniels, P.W., Sendow, I. & Soleha, F. (1996) Longitunal studies of *Culicoides* spp. associated with livestock in Indonesia. *Arbovirus Research in Australia* (ed. by M. F. Uren and B. H. Kay), pp. 203–209., CSIRO/QIMR, Brisbane, Australia.
- Tabachnick, W.J., Mellor, P.S. & Standfast, H.A. (1992) Working Team reports on vectors: recommendations for research on *Culicoides* vector biology. *Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses* (ed. by T.E. Walter and B. I. Osburn), pp. 977–981. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tabachnick, W.J., Robertson, M.A. & Murphy, K.E. (1996) *Culicoides variipennis* and bluetongue disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 791, 219–226.
- Takamatsu, H., Mellor, P.S., Mertens, P.P., Kirkhorn, P.A., Burroughs, J.N. & Parkhouse, R.M. (2003) A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of General Virology*, 84, 227–235.
- Tatem, A.J., Baylis, M., Mellor, P.S., Purse, B.V., Capela, R., Pena, I. & Rogers, P.J. (2003) Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. *Veterinary Microbiology*, 97, 13–29.
- Tenenhaus, M. & Young, F.W. (1985) Analysis and synthesis of multiple correspondence analysis and others methods for quantifying categorical multivariate data. *Psychometrika*, 50, 91–119.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1993) Treecon: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Computer Application in the Biosciences*, 9, 177–182.
- Venter, G.J., Paweska, J.T., Van Dijk, A.A., Mellor, P.S. & Tabachnick, W.J. (1998) Vector competence of *Culicoides bolitinos* and *C. imicola* for South African bluetongue virus serotype 1, 3 and 4. *Medical and Veterinary Entomology*, 12, 378–395.
- Vogler, A.P. & Desalle, R. (1994) Evolution and phylogenetic information content of the ITS₁ region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 393–405.
- White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D. & Beaty, B.J. (2005) Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. *Journal of General Virology*, 86, 453–62.
- Wirth, W.W. & Marston, N.A. (1968) Method for mounting small insects on microscope slides in Canada balsam. *Annals of Entomological Society of America*, 61, 783–784.
- Wittmann, E.J. & Baylis, M. (2000) Climate change: Effects on *Culicoides*. Transmitted viruses and implications for the UK. *Veterinary Journal*, 160, 107–117.
- Wittmann, E.J., Mellor, P.S. & Baylis, M. (2001) Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Revue Scientifique et Technique (OIE)*, 20, 731–740.
- Zientara, S., Grillet, C. & de La Rocque, S. et al. (2001) La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001. *Epidémiologie en Santé Animale*, 40, 129–137.

Accepted 21 December 2005

Original article

Molecular detection of *Culicoides* spp. and *Culicoides imicola*, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe

Catherine CÊTRE-SOSSAH^{a*}, Thierry BALDET^a, Jean-Claude DELÉCOLLE^b,
 Bruno MATHIEU^c, Aurélie PERRIN^a, Colette GRILLET^a, Emmanuel ALBINA^a

^a CIRAD-EMVT, Campus international de Baillarguet, TA30/G, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Université Louis Pasteur de Strasbourg, Musée zoologique, 29 bd de la Victoire,
 67000 Strasbourg, France

^c Entente Interdépartementale pour la Démoustication, 165 avenue Paul Rimbaud,
 34184 Montpellier Cedex 4, France

(Received 12 November 2003; accepted 9 February 2004)

Abstract – Bluetongue (BT) and African Horse Sickness (AHS) are infectious arthropod-borne viral diseases affecting ruminants and horses, respectively. *Culicoides imicola* Kieffer, 1913, a biting midge, is the principal vector of these livestock diseases in Africa and Europe. Recently bluetongue disease has re-emerged in the Mediterranean Basin and has had a devastating effect on the sheep industry in Italy and on the islands of Sicily, Sardinia, Corsica and the Balearics, but fortunately, has not penetrated onto mainland France and Spain. To survey for the presence of *C. imicola*, an extensive light-trap network for the collection of *Culicoides*, was implemented in 2002 in southern mainland France. The morphological identification of *Culicoides* can be both tedious and time-consuming because its size ranges from 1.5 to 3 mm. Therefore, an ITS₁ rDNA polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic assay was developed to rapidly and reliably identify *Culicoides* spp. and *C. imicola*. The aim of this work was to set up a rapid test for the detection of *C. imicola* amongst a pool of insects collected in areas at risk for BT. The sequence similarity of the rDNA (nuclear ribosomal DNA), which is greater within species than between species, is the foundation of its utilisation in species-diagnostic assays. The alignment of the 11 ITS₁ sequences of *Culicoides* obtained from Genbank and EMBL databases helped us to identify one region in the 5' end and one in the 3' end that appear highly conserved. PCR primers were designed within these regions to amplify genus-specific fragments. In order to set up a *C. imicola*-specific PCR, another forward primer was designed and used in combination with the previously designed reverse primer. These primers proved to be highly specific and sensitive and permitted a rapid diagnostic separation of *C. imicola* from *Culicoides* spp.

molecular detection / *Culicoides imicola* / ITS₁ / PCR / bluetongue

1. INTRODUCTION

Bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) are infectious arthropod-borne

viral diseases affecting ruminants and horses, respectively. Bluetongue disease is caused by the bluetongue virus (BTV), which is the prototype of the *Orbivirus*

* Corresponding author: catherine.cetre-sossah@cirad.fr

genus within the Reoviridae family [11]. AHSV is another member of this family and genus. Both viruses are transmitted by certain species of biting midges belonging to the *Culicoides* genus (Diptera: Ceratopogonidae) and are maintained in nature through a series of alternating cycles of replication between its *Culicoides* vectors and susceptible hosts [25].

The spread of bluetongue across all continents pantropically (located between 44° N and 35° S) depends mainly upon the distribution and seasonal abundance of the insect vectors. More than 1 200 *Culicoides* species have been identified in the world [3] but only 17 have been connected with BTV transmission [18]. The major vector species are *C. imicola* and *C. bolitinos* in Africa, *C. imicola* in Asia, *C. fulvus* and *C. brevitarsis* in Australia, *C. sonorensis* in North America, *C. insignis* and *C. pusillus* in South and Central America [17, 18].

As with bluetongue, AHSV is limited to geographical areas where the vector *C. imicola* is present, and its spread depends on the occurrence of climatic conditions favouring vector activity. AHSV is endemic in sub-Saharan Africa but periodically makes brief excursions beyond this area, where it has caused major epizootics extending as far as Pakistan and India in the east, and as far as Morocco, Spain and Portugal in the west [4, 20, 21, 23]. More than 300 000 equines died during the great epizootic of 1959–1961 in the Middle-East and South-West Asia [12]. Until recently, the virus had not survived across more than two seasons in any of these epizootic areas. However, the recent outbreak of AHSV in the western Mediterranean basin, which lasted for five years (1987–1991), has forced us to re-assess the situation with greater vigilance.

The explosive outbreaks of BTV in the Mediterranean Basin since 1998 have been fuelled largely by the classical Afro-Asian vector *C. imicola* [1, 19]. It is known that *C. imicola s.l.* is a complex of at least 10 sibling species but for the time being only *C. imicola s.s.* is present in Europe [16]. In

the eastern Mediterranean Basin, outbreaks of BTV have occurred in Bulgaria, Serbia, Kosovo, Croatia, Montenegro, northern Greece and Bosnia Herzegovina in regions up to 44° 30' N, which is further north within Europe than has ever been seen before, and where *C. imicola* has not been detected during insect surveys [2, 19]. This strongly suggests that here the virus is being transmitted by other vector species, possibly by *C. pulicaris* and one or more species of the *C. obsoletus* complex. These Palaearctic species or species complexes are widespread and abundant in the region and across most of northern Europe.

As a consequence of the discovery of *C. imicola* on the island of Corsica in October 2000 [7], the subsequent BTV serotype 2 outbreaks in the autumn of 2000 and 2001 [29–31], and the relatively high risk of occurrence of this vector in neighbouring coastal mainland in southern France [28], it was decided to study the *Culicoides* fauna of this region. For this purpose, a large light-trap network was implemented in 2002 in southern mainland France to survey for the possible presence of *C. imicola*. The morphological identification of *Culicoides* can be both tedious and time consuming because its size ranges from 1.5 to 3 mm. Thus the aim of this study was to set up a rapid diagnostic test for the detection of *C. imicola* amongst a pool of insects collected in areas where livestock are thought to be at risk for BT. The study of molecular taxonomy and phylogenetic evolution of this genus should also give interesting results.

Nuclear ribosomal DNA (rDNA) has several unique features which make it an ideal DNA target for systematic studies [6]. It consists of tandemly repeated copies of the transcriptional unit with three gene regions (18S, 5.8S and 28S) separated by transcribed spacers [8]. As shown in Figure 1, the external transcribed spacer (ETS) is located upstream of the 18S gene, with the first (ITS₁), and second (ITS₂), internal transcribed spacers (ITS) located between either the genes 18S and 5.8S, or between

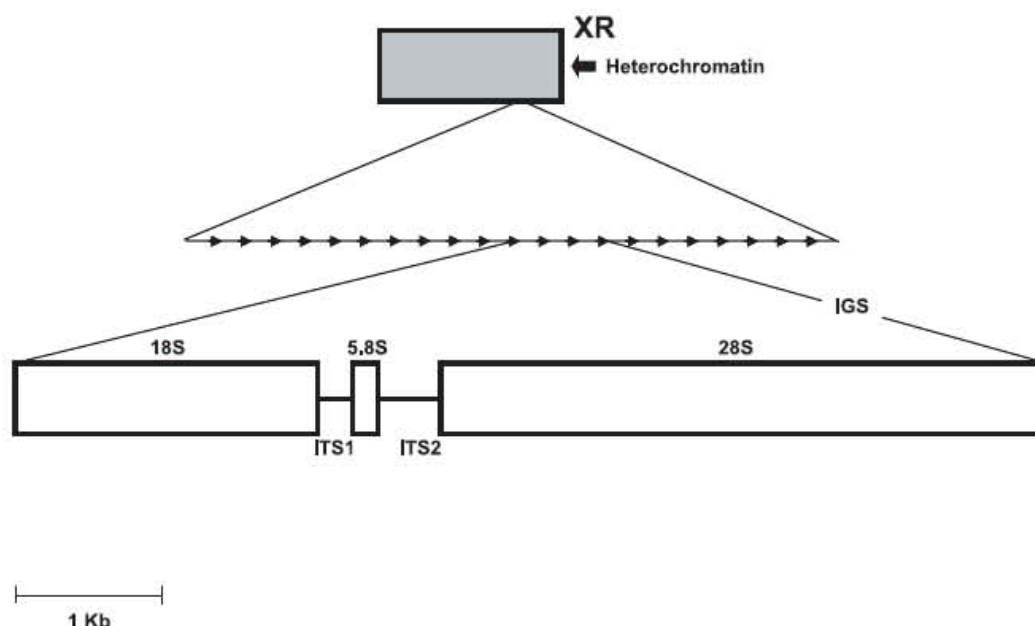


Figure 1. Location and organisation of the ribosomal DNA (rDNA). The rDNA locus consists of one very long array of repeat units (500–700 repeats per genome). Each repeat is 9 kb long and consists of the genes for the 18S, 5.8S, and 28S rDNA (open rectangles). These genes are separated by spacers (solid lines), the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), and the intergenic spacer (IGS). Adapted from [10].

5.8S and 28S, respectively. It contains regions of varying evolutionary rates, from highly conserved regions (e.g. 5.8S and 18S rRNA genes) to more variable ones (e.g. spacers). Sequence similarity of the rDNA, which is greater within than between species, is the foundation of its utilisation for species-diagnostic assays. A recent study using internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA from *Culicoides* has been performed for a phylogenetic analysis of the genus [15]. Previously, rDNA genetic markers have been used for the identification of mosquitoes (*Anopheles gambiae*, *An. nili* and *An. minimus* using ITS) [9, 10, 13, 22, 26]. The alignment of the 11 ITS1 sequences of *Culicoides* obtained from Genbank and EMBL databases helped us to focus on one region in the 5' end and one in the 3' end and appeared highly conserved. Within these regions, PCR primers were designed to amplify genus-specific fragments. In order to set up a *C. imicola*-specific PCR, another forward primer was designed and used in combination with the previously designed

reverse primer. These primers proved to be specific and permitted a rapid diagnostic separation of *Culicoides* spp. from *C. imicola*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Traps and collections

We selected 19 sites at risk for the presence of *C. imicola* in (and possible introduction onto) mainland France. These sites are spread at 50 km intervals along the length of the French Mediterranean coast. One collection/night/site, using standard UV-light traps with a suction fan, was performed monthly from April to November 2002. The traps were set, on each night, between 1 h before sunset to around 8.00 am the following morning. They were located outdoors but within 25 m of livestock premises and were suspended from the walls of buildings 1.5–2 m above the ground. A glass collecting beaker containing 200–300 mL of water (this contained a drop

Table I. Primers used for the genus-specific PCR and *C. imicola* specific PCR.

Primer	Sequence
PanCulF	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'
PanCulR	5'-TGCGGTCTTCATCGACCCAT-3'
Cul-Imicola	5'-ATTACAGTGGCTTCGGCAAG-3'

of detergent to reduce surface tension) was placed at the base of each trap. The collected insects were transported to the laboratory in the water-filled collecting beaker and then recovered and preserved in 90% ethanol. *Ceratopogonidae* were first separated from all other insects. Identification of *Culicoides* was initially based upon wing pattern, and confirmed subsequently by mounting a number of specimens on microscope slides [14, 27].

2.2. Extraction of genomic DNA

Single specimens of *Culicoides* were used for the extraction of DNA. After grinding of the insect in a mortar and pestle containing liquid nitrogen, the genomic DNA was extracted with the DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.3. PCR primers

The gene analysis software Vector NTI (Informax Inc, USA) was used to compare the ITS1 rDNA sequences of the 11 species of *Culicoides* retrieved from Genbank/EMBL databases for the design of primers. Two sets of primers were defined. The first set of primers (PanCulF/PanCulR) was designed for a genus-specific PCR, the other set of primers (Cul-imicola/PanCulR) for a *C. imicola* specific PCR. Table I lists the sequences of the primers used.

2.4. PCR amplification of ITS1

The rDNA locus consists of one very long array of repeat units (500–700 repeats

per genome). Each repeat is 9 kb long and consists of the genes 18S, 5.8S, and 28S rDNA. These genes are separated by spacers, the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), and the intergenic spacer (IGS) (Fig. 1). The ITS1 of each of the eight most abundant species of *Culicoides* and of *C. imicola* was amplified by genus-specific PCR using the PanCulF/PanCulR primers and by *C. imicola* specific PCR using the Cul-imicola/PanCulR primers. Reactions for the PanCulF/PanCulR primers were performed in a total volume of 50 µL consisting of 10 × PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Eurobio, France), 200 ng of each primer, and 2.5 U Taq DNA polymerase under the following cycling conditions: an initial denaturation stage at 94 °C for 5 min; then 30 cycles at 94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 1 min and a final extension phase at 72 °C for 10 min. The reaction for the Cul-imicola/PanCulR primers was the same as described above except for the hybridization temperature that was increased to 60 °C. A volume of 1 µL of genomic DNA was added to each PCR reaction and samples without DNA were included in each amplification run to exclude carry-over contamination. PCR products were examined by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with ethidium bromide.

3. RESULTS

3.1. Collection of *Culicoides* along coastal mainland France

The genus *Culicoides* was represented by 16 197 specimens belonging to 44 species, and were collected during 109 nights of sampling between April and November 2002. No specimens of *C. imicola* were found. Table II summarises the *Culicoides* species composition, expressed as a percentage of the total *Culicoides* population sampled. The species mentioned in this table are the ones representing more than 1% of the whole population.

Table II. Number and percentage of adult *Culicoides* captured between April and November 2002 along coastal mainland France (19 sites/8 months/109 light trap collections).

No.	<i>Culicoides</i>	Number collected	% of the total population sampled
1	<i>C. newsteadi</i>	11 898	73.5
2	<i>C. obsoletus</i>	1 290	8.0
3	<i>C. scoticus</i>	877	5.4
4	<i>C. circumscriptus</i>	526	3.2
5	<i>C. griseidorsum</i>	430	2.7
6	<i>C. pulicaris</i>	188	1.2
7	<i>C. lupicaris</i>	178	1.1
8	<i>C. submaritimus</i>	173	1.1

Table III. Genbank and NCBI accession numbers and lengths of the ITS1 sequences (base pairs) of 11 species of *Culicoides*.

<i>Culicoides</i>	Accession number	Length of ITS1 sequence (base pairs)
<i>C. albicans</i>	AJ417980	461
<i>C. arakawai</i>	AJ489503	460
<i>C. cubitalis</i> (= <i>C. kibunensis</i>)	AJ417979	457
<i>C. grisescens</i>	AJ417987	346
<i>C. imicola</i>	AF074019	316
<i>C. impunctatus</i>	AJ417986	330
<i>C. maritimus</i>	AJ417981	427
<i>C. nubeculosus</i>	AJ417982	332
<i>C. pulicaris</i>	AJ417983	469
<i>C. punctatus</i>	AJ417984	463
<i>C. variipennis</i>	U48380	347

3.2. Alignment of the ITS1rDNA of the 11 species

The ITS1 of the 11 species of *Culicoides* retrieved from EMBL/Genbank databases were aligned using the gene analysis software Vector NTI. Table III lists the accession numbers of each of these sequences and their length. The alignment of the ITS1 sequences (the alignment length was 590 bp including the gaps) revealed two highly conserved regions, between 2 and 28 bp and 564 and 591 bp, respectively (Fig. 2). These regions were used for the design of the genus specific primers but could also be

useful in the future for the molecular identification of *Culicoides*, for studying their molecular genetics and epidemiology, and for vector systematics. The positions of the primers selected for the molecular detection of *Culicoides* are shown in grey-coloured boxes (Fig. 2).

3.3. Amplification of ITS1 by genus-specific PCR

PCR reactions using genus-specific primers (PanCulF/PanCulR) were performed on the eight most-abundant species captured along the French Mediterranean coastline

227

		301		400
Consensus	(301)	AAAATTTCTTGGGTAGCTTTATAGAAGAGCTTTAAA	GACTTGTT	TGCCCAAGGCC CCGTAAACTAGTA
albicans	(270)	CGCTTTTCATATTATGTGT---GTG		
arakawai	(274)	GCATTTTCATATTAATTGT--GTGTG		
cubitalis	(271)	TCATTT-CATATTAAATAGAGGAGTG		
griseus	(174)			
imicola	(161)			
impunctatus	(174)			
pulicaris	(265)	TGCCGA-GAGAATTATTGT--GTGCG		
punctatus	(264)	TGTCGA-GAGAAATTTGT--GTGTG		
maritimus	(186)			
nubeculosus	(175)			
variipennis	(190)			
		401		500
Consensus	(401)	ACCCATTGCGAGGTGGCTAGTATGCATATAC	TT ATTG G TATGCATTGATTTT TTTCA	A GATACATT GGAGTGA GTATAATTGTAATA
albicans	(361)			
arakawai	(367)			
cubitalis	(365)			
griseus	(245)			
imicola	(230)			
impunctatus	(243)			
pulicaris	(358)			
punctatus	(356)			
maritimus	(258)			
nubeculosus	(244)			
variipennis	(259)			
		501		
Consensus	(501)	AATT T TAAACAAAA AAAAAAAGAT	AAAAACCTTAAAC GGGGATCA CTTGGCTCA	TGGATCGATGAAGACCGCAGC
albicans	(450)			
arakawai	(456)			
cubitalis	(453)			
griseus	(336)			
imicola	(318)			
impunctatus	(334)			
pulicaris	(456)			
punctatus	(452)			
maritimus	(341)			
nubeculosus	(331)			
variipennis	(349)			

Alignment of the ITS1 of the 11 species of *Culicoides* known to date. In the figures, dots correspond to conserved nucleotides. Boxed-letters indicate the sequences used to design the primers used for genus-PCR and the *C. imicola*-specific PCR. Block letters are the nucleotides that differ between species.

PanCulR

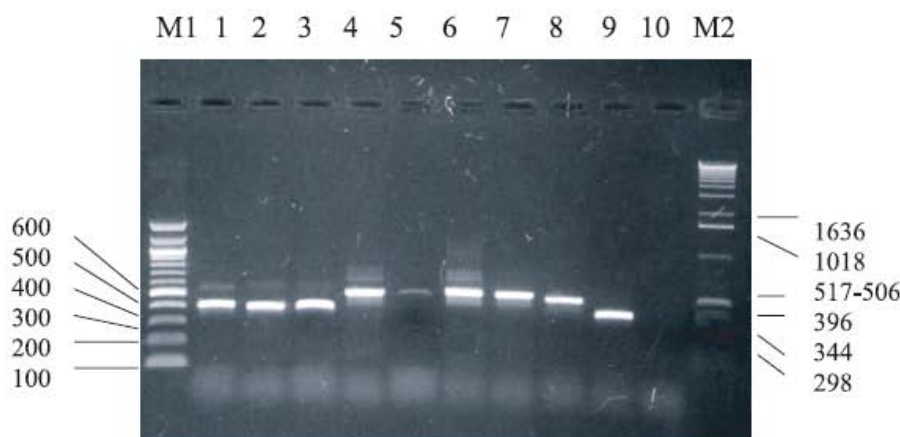


Figure 3. Genus amplification of the 9 *Culicoides* species ITS1 by PCR (PanCulF/PanCulR). M1 represents 100 bp DNA ladder, M2 marker X (Roche, USA). Lanes 1 to 10 correspond respectively to *C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus*, *C. imicola*, Negative Control.

and reference *C. imicola* specimens collected in Corsica in 2001, 150 km distant from southern France. Agarose gel electrophoresis (Fig. 3) showed that the genus-specific amplified PCR products of the nine *Culicoides* species tested (*C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus* and *C. imicola*) occurred between 316 and 500 bp (when compared against the 100 bp DNA ladder marker).

As expected, no band was detected in the negative control. The PCR was also performed on other species of *Culicoides* less commonly found on the French Mediterranean mainland (*C. sahariensis*, *C. kibunensis*, *C. maritimus*, *C. punctatus*, etc.). The results confirmed that the sequences targeted by our primers are highly conserved (data not shown).

3.4. Molecular identification of *C. imicola* by specific ITS1 PCR

PCR reactions were performed in order to evaluate the specificity of *C. imicola* primers (Cul-imicola/PanCulR) for *C. imicola*, compared to other *Culicoides* species. Agarose gel electrophoresis (Fig. 4) showed

no specific PCR products for each of the eight non-*C. imicola* ITS1 species tested (*C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, and *C. submaritimus*). However, a specific band (303 bp) was amplified for *C. imicola*. Again, no band was detected in the negative control. Thus, we developed a specific tool for the detection of *C. imicola*.

3.5. Specificity of the PCR assay

Because surveillance activities for most vector species are performed using pooled genus specimens, we wished to evaluate whether our specific PCR assay was useful to detect *C. imicola* within a pool of other biting midges. Agarose gel electrophoresis (Fig. 5) showed that no specific PCR products were amplified in lane 1, corresponding to a pool of one specimen of each of the eight most-abundant *Culicoides* species (*C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus*). The addition of one or ten specimens of *C. imicola* (lanes 2 and 3 respectively) to this pool yielded the expected band of 303 bp following PCR amplification. Again, no band was

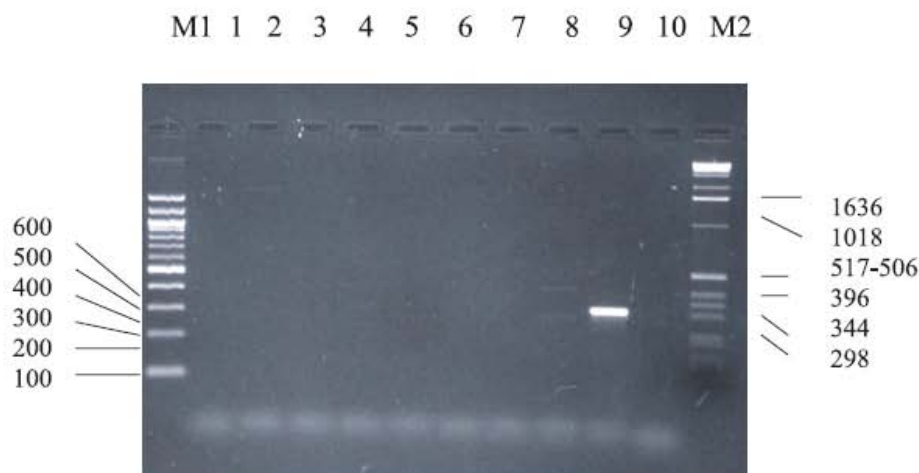


Figure 4. Amplification of the 9 *Culicoides* species ITS1 by specific PCR (Cul-Imicola/PanCulR). M1 represents 100 bp DNA ladder, M2 marker X (Roche, USA). Lanes 1 to 10 correspond respectively to *C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus*, *C. imicola*, Negative Control.



Figure 5. The specificity of the *Culicoides imicola* specific PCR amplification (Cul-Imicola/PanCulR). M1 and M2 represent 100 bp DNA ladder. Lane 1 corresponds to a mix of 1 specimen of each of the eight most abundant species *C. newsteadi*, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. circumscriptus*, *C. griseidorsum*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. submaritimus*. Lanes 2 and 3 are equivalent to lane 1 with one and 10 specimens of *C. imicola* respectively. Lane 4 corresponds to ten specimens of *Forcipomyia* spp. Lanes 5 and 6 correspond to lane 4 with one and 10 specimens of *C. imicola* respectively. Lane 7 corresponds to a pool of different Diptera families (Psychodidae, Chironomidae, Culicidae, Cecidomyiidae, Sciaridae, Tipulidae) and other orders of insects (*Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*) recovered from a light-trap. Lanes 8 and 9 correspond to lane 7 plus one and 10 specimens of *C. imicola* respectively. Lane 10 is the negative control. Lane 11 is a *C. imicola* positive control.

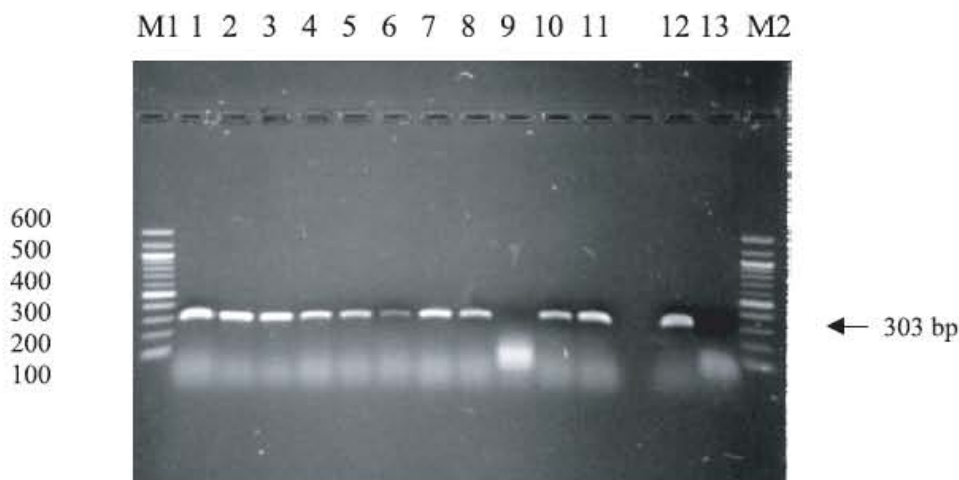


Figure 6. Sensitivity of the *Culicoides imicola* specific PCR amplification (PanCulR/Cul-Imicola). M1 and M2 represent 100 bp DNA ladder. Lanes 1 to 8 correspond respectively to one specimen of *C. imicola* in 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 and 3 200 specimens of *C. newsteadi*. Lane 9 corresponds to 6.5 mg of dried materials recovered from a light trap without any *Culicoides* specimens. Lanes 10 and 11 correspond to lane 9 with one and 10 specimens of *C. imicola* respectively. Lane 11 corresponds to lane 9 with ten specimens of *C. imicola*. Lanes 12 and 13 correspond respectively to the positive and negative controls.

detected (lane 4) following PCR on a pool of 10 specimens of *Forcipomyia* spp., a genus belonging to the Ceratopogonidae family. However, a specific band was amplified when one or ten specimens of *C. imicola* (lanes 5 and 6 respectively) were added to the pool. Finally, a mixture of different insect families recovered from a light-trap equivalent to 6.5 mg of dried materials (lane 7) did not result in the amplification of specific DNA, but when one or ten specimens of *C. imicola* were added (lanes 8 and 9, respectively), amplification of a specific band resulted.

3.6. Sensitivity of the PCR assay

In order to assess the sensitivity of the technique, *C. imicola*-specific PCR reactions were performed on *C. imicola* within a range of pooled specimen sizes. Figure 6 shows agarose gel electrophoresis of specific PCR products that were amplified in serial samples containing one specimen of *C. imicola* in 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 and 3 200 specimens of *C. newsteadi*

(lanes 1 to 8 respectively). Lane 9 corresponds to 6.5 mg of dried material recovered from a light trap without any *Culicoides* specimens, showing that no band was detected. Finally, when one or ten specimens of *C. imicola* were added to the dried material pool from the trap, a specific band was amplified (lanes 10 and 11). As expected, no band was detected in the negative control (lane 13).

4. DISCUSSION

In its recent re-emergence in the Mediterranean Basin, and particularly in Corsica in 2000 and 2001, it is believed that BTM was transmitted principally by the classical Afro-Asiatic insect vector *C. imicola*. However, in the eastern Mediterranean Basin, outbreaks of the disease have occurred in Bulgaria, Serbia, Kosovo, Croatia, Montenegro, northern Greece and in Bosnia Herzegovina where *C. imicola* has not been detected during insect surveys. Recently, the virus was isolated from *Culicoides* represented by one or more species of the

C. obsoletus complex on mainland Italy [24] and *C. pulicaris* on the island of Sicily [5].

C. imicola is also the vector for the African horse sickness, another orbiviral disease that can be especially devastating to equids. The monitoring of *Culicoides* species is therefore essential in areas at risk for the management of animal health. Since the biology of *C. imicola* and its persistence in a given biotope appear to be largely influenced by climatic conditions, the spectre of possible global climate change suggests that monitoring efforts should be sustained over a long period of time. This is particularly true in areas like southern France where trapping frequencies will be increased to sample high quantities of insects for an early detection of *C. imicola*. However, in such extensive monitoring programmes the morphological identification of *Culicoides* has been limited to the labour-intensive and time consuming techniques of morphological taxonomy, species prevalence and geographic distribution. This is the reason why we decided to investigate the possibility to detect *Culicoides* spp. and *C. imicola* using molecular tools. From the molecular point of view, recent studies on this genus hold promise for the development of tools that will lead to the rapid and reliable identification of *C. imicola* and other potential vectors of BTV [15]. The nuclear ribosomal DNA arrays of eukaryotic organisms usually consist of tandemly repeated copies of the transcriptional unit and non-transcribed spacer, the rDNA transcriptional unit consisting of three gene regions (i.e. 18S, 5.8S and 28S) separated by transcribed spacers [8]. As shown in Figure 1, the external transcribed spacer (ETS) is located upstream of the 18S gene, with the first (ITS-1) and second (ITS-2) internal transcribed spacers (ITS) located between either genes 18S and 5.8S, or between 5.8S and 28S, respectively. The rDNA has several unique features which make it an ideal target for use in DNA species-diagnostic assays [6]. It contains regions of varying evolutionary rates, from highly conserved regions (e.g. 5.8S and 18S rRNA genes) to more variable

ones (e.g. spacers). Species from other genera have been studied also showing that rDNA provides genetic markers for the identification of mosquitoes (*Anopheles gambiae*, *An. nili* and *An. minimus* using ITS) [9, 10, 13, 22, 26]. In another study the ITS1 sequences of *C. arakawai*, and eight other species, were used to produce an initial partial phylogeny of the species within the genus [15].

Thus, our objective in this study was to establish a diagnostic test for the rapid detection of the main BTV-transmitting species, *C. imicola*. Even if the ITS1 sequences of most of the species present in the Mediterranean Basin remain unknown, the choice of the primers in a highly conserved region amongst sequenced species, should serve for the detection of the majority of *Culicoides* species. After genus PCR reaction, the nine *Culicoides* species (including *C. imicola*), yielded an amplified fragment of 316 to 500 bp. Other *Culicoides* species could also be detected by these primers (data not shown), thus demonstrating the validity of our initial hypothesis. Interestingly, the highly variable size of the amplified products (up to 180 bases) illustrates that ITS-1 may differ widely between species of the same genus. This reinforces the potential interest of ITS-1 for phylogenetic studies of *Culicoides*. We are now sequencing all our PCR products with the objective of performing a phylogenetic analysis.

The specific *C. imicola* primer was designed to amplify in a more variable region where numerous substitutions or deletions were present. The primer that was selected proved to be specific for *C. imicola*. Because two forward primers combined with a unique reverse primer provides resolution at the genus and species levels, development of a useful multiplex PCR should be possible. We are now evaluating this possibility as well as developing a real-time PCR test as a faster and quantitative diagnostic tool.

When we evaluated the sensitivity of our PCR, we found that only one specimen of each *Culicoides* was sufficient to obtain a

PCR product. In addition, our PCR was able to specifically detect one *C. imicola* within 3 200 other *Culicoides* (Fig. 6) or within 6.5 mg of dried materials collected from a light trap. That amount of material (6.5 mg) represents approximately a third of the insect mass collected by a light trap during the maximum *Culicoides* activity period in France. Interestingly, the sensitivity of our PCR was greatly improved when the genomic DNA was diluted by 10 before amplification. The robust nature of this technique for *C. imicola* surveillance is also demonstrated by its ability to specifically detect one specimen of *C. imicola* within 8 other *Culicoides* species, within 10 specimens of *Forcipomyia* spp., or within a pool of different Diptera families and other orders of insects.

Another potential application of this work will be to adapt this technique to *Culicoides* larvae, in order to help in the identification of the larvae and then in the characterisation of their morphological differences and also to define the larvae biotope of *C. imicola* and the biological parameters which are involved in their development (duration, diapause, aestivation).

In conclusion, we developed a rapid and qualitative diagnostic tool for *Culicoides* spp. and *C. imicola* that should be useful for routine epidemiological and surveillance monitoring of this orbivirus vector. Our work also suggests that specific forward primers for other *Culicoides* species that are vectors for bluetongue or African horse sickness virus could be designed and used as well.

REFERENCES

- [1] Baylis M., The re-emergence of bluetongue, *Vet. J.* 164 (2002) 5–6.
- [2] Baylis M., Mellor P.S., Bluetongue around the Mediterranean in 2001, *Vet. Rec.* 149 (2001) 659.
- [3] Borkent A., Wirth W.W., World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), *Bulletin of the American Museum of Natural History* No. 233, 257 p.
- [4] Capela R., Purse B.V., Pena I., Wittman E.J., Margarita Y., Capela M., Romao L., Mellor P.S., Baylis M., Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses, *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003) 165–177.
- [5] Caracappa S., Torina A., Guercio A., Vitale F., Calabro A., Purpari G., Ferrantelli V., Vitale M., Mellor P.S., Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily, *Vet. Rec.* 153 (2003) 71–74.
- [6] Collins F.H., Paskewitz S.M., A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species, *Insect. Mol. Biol.* 5 (1996) 1–9.
- [7] Delécolle J.C., de La Rocque S., Contribution à l'étude des *Culicoides* de Corse. Liste des espèces recensées en 2000/2001 et redescription du principal vecteur de la fièvre catarrhale ovine: *C. imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae), *Bull. Soc. Entomol. Fr.* 107 (2002) 371–379.
- [8] Elder J.F., Turner B.J., Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes, *Q. Rev. Biol.* 70 (1995) 297–320.
- [9] Gentile G., Slotman M., Ketmaier V., Powell J.R., Caccone A., Attempts to molecularly distinguish cryptic taxa in *Anopheles gambiae* s.s., *Insect. Mol. Biol.* 10 (2001) 25–32.
- [10] Gentile G., Della Torre A., Maegga B., Powell J.R., Caccone A., Genetic differentiation in the African malaria vector, *Anopheles gambiae* s.s., and the problem of taxonomic status, *Genetics* 161 (2002) 1561–1578.
- [11] Holmes I.H., Boccardo G., Estes M.K., Furuichi M.K., Family Reoviridae, in: Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A. (Eds.), *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Springer, Wien, New York, Arch. Virol. Suppl. 10 (1995) 208–239.
- [12] Howell P., The 1960 epizootic of AHS in the middle East and SW Asia, *J. South African Vet. Med. Assoc.* 31 (1960) 329–334.
- [13] Kengne P., Awono-Ambene P., Antonio-Nkondjio C., Simard F., Fontenille D., Molecular identification of the *Anopheles nili* group of African malaria vectors, *Med. Vet. Entomol.* 17 (2003) 67–74.
- [14] Kremer M., Contribution à l'étude du genre *Culicoides* Latreille particulièrement en France, *Encyclop. Ent. Série A*, Ed. P. Lechevallier, Paris, 1965, 299 p.

- [15] Li G.Q., Hu Y.L., Kanu S., Zhu X.Q., PCR amplification and sequencing of ITS1 rDNA of *Culicoides arakawai*, Vet. Parasitol. 112 (2003) 101–108.
- [16] Linto Y.M., Mordue Luntz A.J., Cruickshank R.H., Meiswinkel R., Mellor P.S., Dallas J.F., Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex, Med. Vet. Entomol. 16 (2002) 139–146.
- [17] Meiswinkel R., Afrotropical *Culicoides*: a redescription of *C. (Avaritia) imicola* Kieffer, 1913 (Diptera: Ceratopogonidae) with description of the closely allied *C. (A.) bolitinos* sp. nov. reared from the dung of the African buffalo, blue wildebeest and cattle in South Africa, Onderstepoort J. Vet. Res. 56 (1989) 23–39.
- [18] Mellor P.S., The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 162 (1990) 143–161.
- [19] Mellor P.S., Wittmann E.J., Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998–2001, Vet. J. 164 (2002) 20–37.
- [20] Mellor P.S., Boorman J., Baylis M., *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors, Annu. Rev. Entomol. 45 (2000) 307–340.
- [21] Miranda M.A., Borrás D., Rincon C., Alemany A., Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group, Med. Vet. Entomol. 17 (2003) 52–54.
- [22] Paskewitz S.M., Ng K., Coetzee M., Hunt R.H., Evaluation of the polymerase chain reaction method for identifying members of the *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) complex in southern Africa, J. Med. Entomol. 30 (1993) 953–957.
- [23] Sarto i Monteys V., Saiz-Ardanaz M., *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors, Med. Vet. Entomol. 17 (2003) 288–293.
- [24] Savini G., Goffredo M., Monaco F., de Santis P., Meiswinkel R., Transmission of bluetongue virus in Italy, Vet. Rec. 152 (2003) 119.
- [25] Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P., Kirkham P.A., Burroughs J.N., Parkhouse R.M., A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector, J. Gen. Virol. 84 (2003) 227–235.
- [26] Van Bortel W., Trung H.D., Roelants P., Harbach R.E., Backeljau T., Coosemans M., Molecular identification of *Anopheles minimus* s.l. beyond distinguishing the members of the species complex, Insect. Mol. Biol. 9 (2000) 335–340.
- [27] Wirth W.W., Marston N., A method for mounting small insects on microscope slides in canada balsam, Ann. Entomol. Soc. Am. 61 (1968) 783–784.
- [28] Wittmann E.J., Mellor P.S., Baylis M., Using climate data to map the potential distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe, Rev. Sci. Tech. 20 (2001) 731–740.
- [29] Zientara S., De la Rocque S., Gourreau J.M., Gregory M., Diallo A., Hendricks P., Libeau G., Sailleau C., Delécolle J.C., La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000, Épidémiologie et santé animale 38 (2000) 133–144.
- [30] Zientara S., Grillet C., De la Rocque S., Gourreau J.M., Gregory M., Diallo A., Hendricks P., Libeau G., Sailleau C., Albina E., Breard E., Delécolle J.C., La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2001, Épidémiologie et santé animale 40 (2001) 129–137.
- [31] Zientara S., Sailleau C., Dauphin G., Roquier C., Remond E.M., Lebreton F., Hammoumi S., Dubois E., Agier C., Merle G., Breard E., Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome, Vet. Rec. 150 (2002) 598–601.

Résumé

La Fièvre Catarrhale Ovine est une maladie infectieuse, virale, non contagieuse affectant les ruminants domestiques et sauvages. L'importance économique de cette maladie est liée d'une part aux pertes directes (mortalité, avortements) et indirectes (mauvaise qualité de la laine, retard de croissance) observées sur les animaux infectés et d'autre part au blocage des frontières limitant les exportations. Le virus de la FCO appartient à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orbivirus*. Il est transmis essentiellement par des moucheron hémaphages du genre *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*). Il existe, à l'heure actuelle, 24 sérotypes dont 6 en Europe. La stratégie vaccinale actuelle consiste à utiliser des vaccins à virus atténué ou à virus inactivé. Cependant, ces vaccins spécifiques d'un sérotype donné ne protègent pas en cas d'épizooties dues à plusieurs sérotypes. L'utilisation de vaccins multivalents est alors jusqu'ici nécessaire. L'objectif de ce travail de thèse est le développement de vaccins dits de « nouvelle génération » induisant une protection de longue durée contre un maximum de sérotypes, en une seule injection. Pour se faire, la construction vaccinale repose sur une souche atténuée du virus de la dermatose nodulaire contagieuse (*Capripoxvirus: Poxviridae*) exprimant différents gènes choisis du virus de la FCO. Ainsi, quatre virus recombinants distincts exprimant individuellement les protéines structurales VP2, VP7 ou les protéines non structurales NS1, NS3 du virus de la FCO ont été générés par recombinaison homologue et testés *in vivo*. Une réponse immunitaire, de type humorale et cellulaire, à la fois contre le vecteur viral et contre les transgènes, ainsi qu'une protection partielle ont été mises en exergue après à une épreuve homologue par le biais d'expérimentations animales menées sur chèvres et moutons.

Mots-clés : Fièvre catarrhale ovine, vaccin capripoxvirus, immunogénicité, protection partielle

Discipline : Virologie

Aurélien PERRIN

Laboratoire : CIRAD - Département Systèmes Biologiques, UPR 15 "Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes", Campus International de Baillarguet, 34398 MONTPELLIER cedex 5, France.